

**Untersuchung zur Funktion der putativen Kofaktoren des
Progesteron-Rezeptors COPRA und CAP350**

Inauguraldissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.
des Fachbereichs Bio- und Geowissenschaften
an der
Universität GH Essen

vorgelegt von

Fabian Esser

aus
Dortmund

April 2001

Die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Experimente wurden am Institut für Zellbiologie (Tumorforschung) an der Universität GH Essen durchgeführt.

1. Gutachter: PD Dr. Klein-Hitpaß

2. Gutachter: Prof. Dr. Esche

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Horsthemke

Tag der mündlichen Prüfung: 15. August 2001

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	4
1.1 Der Initiationskomplex der RNA-Polymerase II katalysierten Transkription	6
1.2 Die Struktur von Chromatin und die Wirkung auf die Transkription	7
1.3 Die Domänenstruktur der Steroidhormon-Rezeptoren	9
1.4 Die Transaktivierung durch die Steroidhormon-Rezeptoren	10
1.5 Der Aufbau der Mikrotubuli	12
1.6 Der Aufbau und die Wirkungsweise des Centrosoms	13
1.7 Das Centrosom in der Spermiogenese	17
1.8 Zielsetzung der Arbeit	18
2 Materialien und Methoden	19
2.1 Chemikalien und Enzyme	19
2.2 Bakterien und Bakterienkultur	19
2.2.1 Transformation von E. Coli	19
2.2.2 Präparation von Plasmid-DNA	20
2.3 Proteinexpression	20
2.3.1 Expression von GST-Fusionsproteinen in E. Coli	20
2.3.2 Transfervektoren für die Baculovirus-Expression	20
2.3.3 Proteinexpression mit dem Baculovirus-System	21
2.4 Zelllinien und Zellkultur	21
2.4.1 Transiente Transfektionen	21
2.4.2 Präparation von Ganzzelextrakten	21
2.4.3 FACS Analyse	22
2.5 Gelelektrophorese	22
2.5.1 Native Agarosegelelektrophorese	22
2.5.2 Denaturierende Formaldehyd-Agarosegelelektrophorese	22
2.5.3 Native Polyacrylamidgelelektrophorese	22
2.5.4 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese	23
2.5.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)	23
2.6 Analyse von Nukleinsäuren	23
2.6.1 Gesamt-RNA Präparation	23
2.6.2 Southern-Analysen	23
2.6.3 Northern-Analysen	24
2.6.4 Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion	24
2.7 Bestimmung von Proteinkonzentrationen	25
2.8. Immunochemische Methoden	25
2.8.1 Generierung von polyklonalen Antikörpern	25
2.8.2 Affinitätsreinigung von polyklonalen Antikörpern	25
2.8.3 Westernblot	25
2.8.4 Immunfluoreszenzanalyse von Zellkulturzellen	26
2.8.5 Immunfluoreszenzanalyse von Quetschpräparaten	26
2.8.6 Immunfluoreszenzanalyse von Gewebeschnitten	27
2.9 Erstellung und Fraktionierung von Kernextrakten	27
2.9.1 Präparation von Rattenleber-Kernextrakt	27

2.9.2 Phosphocellulose P11-Chromatographie.....	28
2.9.3 DEAE-Sepharose Chromatographie.....	28
2.9.4 MonoQ-Chromatographie.....	28
2.9.5 Phenylsepharose FastFlow (high sub) – Chromatographie.....	29
2.9.6 Affinitätsanreicherung von PR interagierenden Proteinen.....	29
2.9.7 Affinitätsanreicherung mit GST-Fusionsproteinen	29
2.10 In-vitro Assembly und Analyse von Chromatin.....	30
2.10.1 Präparation von Xenopus Oocyten-Assemblyextrakt	30
2.10.2 Chromatinassemblierung Reaktion	31
2.10.3 Micrococcal-Nuklease-Verdau Reaktion.....	31
2.11 Zellfreie Transkriptionsreaktion.....	32

3 Ergebnisse.....33

3.1 Die in-vitro Transkription unter Zugabe von Rattenleber-Kernextrakt.....	33
3.2 Die Suche nach Kofaktoren des PR in einem rekonstituierten in-vitro Transkriptionssystem	35
3.3 Weitere Aufreinigung der COPRA enthaltenden MonoQ-Fraktion.....	38
3.4 Affinitätschromatographische Ansätze zur COPRA Anreicherung.....	39
3.4.1 Affinitätsreinigungs-Ansatz durch die PR-COPRA Interaktion.....	39
3.4.2 Affinitätsreinigungs-Ansatz von COPRA durch CBP Komplexe.....	41
3.5 Charakterisierung der für die COPRA Wirkung notwendigen PR Domänen.....	43
3.5.1 Der Einfluß der Helix 12 des PR auf die COPRA Aktivität.....	43
3.5.2 Squelchingexperimente zur Bestimmung der für die COPRA Wirkung notwendigen PR Domänen.....	45
3.6 Analyse des Einflusses von COPRA auf den PR im Chromatiumfeld.....	47
3.6.1 Analyse von in-vitro assembliertem Chromatin.....	47
3.6.2 Analyse des Einflusses von COPRA auf die nukleosomale Struktur.....	49
3.6.3 Analyse der COPRA Wirkung bei der PR vermittelten Transaktivierung in der in-vitro Chromatintranskription.....	51
3.7 Die cDNA- und Proteinsequenz von CAP350.....	53
3.8 Der Nachweis von CAP350 auf Proteinebene.....	58
3.8.1 Die Bestimmung der zellulären Lokalisation von CAP350 durch Immunfluoreszenzmikroskopie.....	58
3.8.2 Nachweise von CAP350 im Westernblot.....	64
3.9 Die Charakterisierung von CAP350.....	67
3.9.1 Analyse der PR - CAP350 Interaktion	67
3.9.2 Der Einfluß der Mikrotubulibindung auf die Lokalisation von CAP350.....	67
3.9.3 Lokalisationsstudien mit CAP350 Deletionsmutanten.....	70
3.9.4 Der Einfluß von CAP350-Überexpression auf den Zellzyklus.....	73
3.10 Die Expression von CAP350 in unterschiedlichen Zelllinien.....	74
3.11 Die Expression von CAP350 in unterschiedlichen Geweben.....	77
3.11.1 Die mRNA und Protein Expression von CAP350 in der Spermiogenese.....	77
3.11.2 Die Proteinexpression von CAP350 in Leber und Lunge.....	83
3.12 Die evolutionäre Konserviertheit des CAP350 Proteins.....	85

4 Diskussion.....	87
4.1 Der Kofaktor COPRA.....	87
4.1.1 Die Aufreinigung von COPRA.....	87
4.1.2 Wirkungsmechanismus von COPRA.....	89
4.1.3 Der Einfluß von COPRA auf die Chromatintranskription.....	91
4.1.4 Die weitere Analyse der PR Aktivierung durch COPRA.....	92
4.2 Das centrosomal-assoziierte Protein von 350 kD Größe (CAP350).....	93
4.2.1 Die CAP350 DNA- und Proteinsequenz.....	93
4.2.2 Die Analyse der bedeutenden CAP350 Struktur motive.....	97
4.2.3 Die Interaktion von CAP350 mit dem PR.....	99
4.2.4 Die Expression und möglich Funktion von CAP350.....	101
4.2.5 Die CAP350 Expression im Hodengewebe.....	105
5 Zusammenfassung.....	107
6 Literaturverzeichnis.....	108
7 Anhang.....	125
Abkürzungsverzeichnis.....	133

1 Einleitung

Eine eukaryotische Zelle besteht aus einem Zellkern und den ihn umgebenden Cytoplasma. Der Zellkern, der durch eine doppelte Membran von dem Cytoplasma getrennt wird (Comes and Franke, 1970), enthält die genomische Erbinformation der Zelle. Die Transkription der aktiven Gene der Zelle findet direkt im Zellkern statt. Zur Initiation der Transkription bedarf es eines komplizierten Zusammenspiels der Proteine des Initiationskomplexes mit den Promotorelementen der DNA. Neben den „core“-Promotor Proteinen, zu denen das TATA-Box Binding Protein (TBP) zählt (Hernandez, 1993), das spezifisch an die TATA DNA Sequenz im Promotor binden kann, binden auch diverse Transkriptionsfaktoren DNA spezifisch in die Promotorregion, die 5' von dem eigentlichen Transkriptionsstartpunkt liegt. Zu den Transkriptionsfaktoren können auch die Steroid-Rezeptoren (SR), zu denen der Progesteron-Rezeptor (PR) gehört, gezählt werden. Auch Koaktivatoren bzw. Korepressoren, die mit bestimmten Transkriptionsfaktoren interagieren können, spielen bei der Regulation der Initiation und insgesamt der Transkription eine entscheidende Rolle. Die DNA liegt im Zellkern nicht „nackt“ vor, sondern ist in einer Chromatinstruktur verpackt. Die einfachste Stufe der Chromatinstruktur ist die Nukleosomen-Struktur. Je 146 bp windet sich die DNA zweifach um den nukleosomalen „core“-Proteinkomplex, der aus jeweils zwei Histonmolekülen H2A, H2B, H3 und H4 besteht (Arents et al., 1991; Moudrianakis and Arents, 1993; Luger et al., 1997). Die Linker DNA, also der Bereich zwischen zwei „core“- Nukleosomen, wird von dem Histon H1 gebunden, wobei die von H1 gebundene DNA etwa 10 bp am Ein- bzw. Austritt der DNA aus dem „core“-Nukleosom umfaßt (Allan et al., 1980, 1981, 1986; Staynov and Crane-Robinson, 1988). Chromatinverpackte DNA ist für sequenzspezifische DNA bindende Faktoren schlechter zugänglich als „nackte“ DNA (Li and Wrang 1993). Die Chromatinstruktur transkribierter Gene ist häufig aufgelockert und so für DNA bindende Proteine zugänglicher als inaktive, stark kondensierte DNA Bereiche (Chen and Allfrey 1987; Chen et al., 1990). Eine Auflockerung des Chromatins wird häufig durch die Acetylierung der „core“ Histone H2A, H2B, H3 und H4 bewirkt (Brownell et al., 1996; Csordas, 1990). Histon acetylierende Eigenschaften konnte von einigen Kofaktoren, wie z.B. CBP, p/CAF, p300 (Ogryzko et al., 1996; Yang et al., 1996) und auch von dem Steroid Rezeptor Koaktivator 1 (SRC-1) (Onate et al., 1995), der spezifisch mit Steroidrezeptoren interagiert, gezeigt werden.

Die Initiation der Transkription endet nach der Bildung der ersten Phosphodiester-Bindung der „heterogenous-nuclear“-RNA (hnRNA). Der Initiationskomplex löst sich auf und die RNAPII geht von der Initiationsphase in die Elongationsphase über (Zawel and Reinberg, 1993). Durch die Verwendung der genomischen DNA als Matrize entsteht durch diese Elongation die hnRNA. Nach

dem Spleißen und nach der Verlängerung der Sequenz um ca. 200 Adenosine (Polyadenylierung) am 3'-Ende, entsteht die mRNA. Diese mRNA gelangt durch Transportmechanismen und durch Diffusion in das Cytoplasma und wird dort von der Translationsmaschinerie als Matrice für die Proteinbiosynthese verwendet. Die so entstandenen Proteine gelangen von dort per Diffusion oder durch gerichteten, aktiven Transport an ihren Zielort. Der aktive, gerichtete Transport von Proteinen und ganzen Zellorganellen erfolgt durch Motorkomplexe. Diese transportieren entweder an den Mikrotubuli, die aus α - und β -Tubulin Dimeren bestehen, oder an den Actinfilamenten entlang die Proteine vom Cytoplasma in Richtung Zellkern oder andersherum (Kull et al., 1996; Gill et al., 1991; Mermall et al., 1998). Für die Assemblierung der Mikrotubuli ist das Centrosom, das aus den beiden orthogonal zueinander stehenden Centriolen, die aus jeweils neun zylindrisch angeordneten Mikrotubuli und der umgebenden pericentriolaren Matrix (PCM) bestehen, entscheidend, da es das wichtigste Mikrotubuli Organisationscenter (MTOC) der Zelle darstellt (Dichtenberg et al., 1998; Mignot, 1996; Bergen et al., 1980). Gebunden (nucleated) werden die Mikrotubuli in der PCM über den γ -Tubulin-Ring-Komplex (γ -TuRC) (Moritz et al., 1995). Das Centrosom ist durch diese Mikrotubuli Nukleation in der Lage, die Polymerisation der Mikrotubuli zu überwachen und die Mikrotubuli in sinnvolle Strukturen zu organisieren. Während der Mitose gehen etliche Mikrotubuli vom Centrosom in Richtung der Chromosomen aus und auch während der Interphase wachsen die Mikrotubuli in den meisten Zellen vom Centrosom aus. Bei der normalen Zellteilung wird sowohl die chromosomale DNA als auch die beiden Centriolen des Centrosoms verdoppelt, da jede Tochterzelle ein neues funktionsfähiges Centrosom mit zwei Centriolen enthalten muß. Der Duplikationsprozeß der Centriolen beginnt in der G1 Phase des Zellzyklus. In der G2 Phase enthält die Zelle zwei nah beieinander liegende Centrosomen, die sich in der G2-M Phase an die gegenüberliegenden Seiten des Zellkerns bewegen und von dort die für die Aufteilung der Chromosomen während der Zellteilung notwendigen Mikrotubuli polymerisieren (Hinchcliffe et al., 1998; Lange and Gull, 1995). Auch während den meiotischen Teilungen, in denen die Zellen aus dem doppelten Chromosomensatz einen einfachen Chromosomensatz erlangen, ist das Centrosom an den Teilungsschritten beteiligt. Damit nach der Befruchtung der Oocyten durch ein Spermium nicht mehrere Centrosomen in der Zygote vorhanden sind, wodurch eine normale Zellteilung nicht möglich wäre, werden die Centriolen in den Oocyten vor der Befruchtung abgebaut (Huchon et al., 1981; Zamboni and Mastroianni, 1966; Greenfield, 1966; Sathananthan et al., 1997; Hertig and Adams 1967), wohingegen bei den meisten Spezies die Centriolen in den Spermien erhalten bleiben (Bernardini et al., 1986; Zamboni and Stefanini 1971; Le Guen and Crozet, 1989). Eine Ausnahme bilden hier die Nagetiere, bei denen die Centriolen auch in den Spermien abgebaut werden (Woolley and Fawcett, 1973).

1.1 Der Initiationskomplex der RNA-Polymerase II katalysierten Transkription

Die RNA Polymerase II, die neben einer Reihe kleiner RNAs die Protein kodierenden Gene transkribiert, besteht aus 12 konservierten Untereinheiten (Woychik and Young, 1990), wobei die RNA Polymerase II und die Generellen Transkriptionsfaktoren (GTFs), die mit TFIIA, -B, -D, -E, -F und -H bezeichnet werden (Roeder et al., 1976, Weil et al., 1979; Matsui et al., 1980), in-vitro auf der DNA in einer definierten Reihenfolge assemblieren und so den Präinitiationskomplex (PIC) bilden (Zawel and Reinberg, 1993, Buratowski et al., 1989; Maldonado et al. 1990, van Dyke et al. 1988). Da einige GTFs in-vivo auch ohne die DNA zu binden mit dem RNA Polymerase II Komplex (RNA Polymerase II Holoenzym) interagieren, scheint in-vivo direkt ein vorgebildeter RNA-Polymerase II Holoenzymkomplex an die DNA zu binden (Ranish et al., 1999; Myer and Young, 1998; Koleske and Young, 1994; Conaway and Conaway, 1993; Buratowski et al., 1989).

Eukaryotische RNA Polymerase II Promotoren werden in „core“ Elemente und regulatorische Elemente eingeteilt (Struhl, 1995), wobei die „core“ Elemente die Stellen auf der DNA definieren, an die der Transkriptions-Präinitiations Komplex (PIC) bindet. Die „core“ Elemente umfassen zum einen die TATA Box, die „upstream“ vom Transkriptionsstartpunkt liegt, die Initiator Sequenz (Inr), die den Transkriptionsstartpunkt umgibt, und zum anderen das „downstream promotor element“ (DPE), das ca. 30 bp 3' von dem Transkriptionsstartpunkt liegt. Dieses DPE scheint im Zusammenspiel mit dem Inr Element als TFIID Bindungsstelle in TATA-losen Promotoren zu wirken (Burke et al., 1996).

Die TATA DNA Sequenz liegt in Eukaryonten in der Regel zwischen 25 und 30 bp von dem Transkriptionsstartpunkt entfernt und stellt die Bindungsstelle für das „TATA binding protein“ (TBP) dar (Buratowski et al., 1988). Durch biochemische Analysen konnte TBP als Bestandteil eines ca. 750 kD großen TFIID Komplexes identifiziert werden. Dieser Komplex besteht neben TBP aus acht weiteren TBP-assoziierten Faktoren (TAFs) (Dymlacht et al., 1991; Tanese and Tjian, 1993). TBP unterscheidet sich von den meisten DNA bindenden Faktoren dadurch, daß es die DNA in der kleinen Furche der DNA-Doppelhelix bindet (Lee et al., 1991). Die TBP-DNA Bindung geschieht relativ langsam und ist ein limitierender Schritt in der Transkriptionsaktivierung (Klein and Struhl, 1994; Liebermann and Berk., 1994). In in-vitro Transkriptionsreaktionen zeigte sich zudem, daß ein Komplex, der aus den GTFs und der RNA-Polymerase II besteht, für eine geringe basale Transkription ausreicht (Roeder, 1996). Für die Transkriptionsaktivierung sind jedoch genspezifische, regulatorische Elemente, die „upstream“ vom „core“ Promotor liegende Sequenzen umfassen, notwendig. An diesen regulatorischen Elementen binden bestimmte Transkriptionsfaktoren, die die Transkriptionsinitiationsrate beeinflussen (Hernandez, 1993). Die Transkriptions-

faktoren bestehen im allgemeinen aus einer DNA-Bindungsdomäne und aus einer bzw. mehreren Aktivierungsdomänen (Verrijzer and Tjian, 1996). Nach Bindung der für den jeweiligen Transkriptionsfaktor spezifischen DNA-Sequenz beeinflusst der Transkriptionsfaktor die Ausbildung, Konformation, Aktivität und Stabilität des Präinitiationskomplexes durch direkte oder indirekte Interaktion (Hernandez 1993; Tjian and Maniatis, 1994; Goodrich et al., 1996), wobei die Interaktionen von Transkriptionsaktivatoren mit Proteinen des Präinitiationskomplexes durch proteinbiochemische und genetische Nachweismethoden bestätigt werden konnte. Von TBP wurden Interaktionen mit den Transkriptionsfaktoren E1A des Adenovirus und mit IE2 (immediately early protein 2) gezeigt (Hagemeier et al., 1992; Horikoshi et al., 1991). Außerdem wird die TBP-DNA Bindung durch die TBP-MOT1 Interaktion reguliert, so daß TBP nicht an inaktive Promotoren, sondern nur Aktivator vermittelt unter Beteiligung von TFIIA DNA bindet (Madison and Winston, 1997). Weiterhin interagiert der Herpes simplex Transkriptionsfaktor VP16 nicht nur direkt mit TBP, sondern auch indirekt über die Interaktion mit TFIIB, TFIIF und dem humanen TAF32 (Stringer et al., 1990; Lin et al., 1991; Goodrich et al., 1993; Xiao et al., 1994; Klemm et al., 1995). Von den TAFs konnte gezeigt werden, daß einige dieser TBP assoziierten Proteine in direktem Kontakt mit Transkriptionsaktivatoren und andere wiederum entweder mit weiteren TAFs interagieren oder selber die Promotor-DNA binden (Burke et al., 1997; Chen et al., 1994; Goodrich et al., 1993; Hoey et al., 1993; Thut et al., 1995). So wurde z.B. festgestellt, daß dTAF110 mit dem Progesteron-Rezeptor und hTAF30 mit dem Östrogen-Rezeptor interagiert (Schwerk et al., 1995; Jacq et al., 1994). Die TAFs scheinen somit an der Transkriptionsaktivierung dadurch beteiligt zu sein, daß sie die Aktivationsinformation der Aktivatoren an die „core“ Transkriptionsmaschinerie weitergeben und so Brückenfunktionen übernehmen.

1.2 Die Struktur von Chromatin und die Wirkung auf die Transkription

Die einfachste Chromatinorganisation stellt die Nukleosomenstruktur dar, bei der die DNA zweifach um die „core“ Nukleosomen, die aus jeweils zwei H2A, H2B, H3 und H4 Histonen bestehen, in einer Länge von 146 bp gewunden ist (Arents et al., 1991; Moudrianakis and Arents, 1993; Luger et al., 1997). Wie wichtig die Histone für die Zelle sind, wird durch die enorme Konserviertheit dieser Proteine in unterschiedlichen Spezies deutlich. So unterscheidet sich das Histon H4 von Kühen und Erbsen nur an 2 der insgesamt 102 Aminosäuren langen Sequenz (De Lange et al., 1969). Alle „core“ Histone sind kleine ca. 11 bis 16 kD große basische Proteine, die einen großen Anteil von Lysin- und Arginin-Aminosäuren enthalten (Ausio and van Holde, 1988). Die „core“ Histone enthalten am C-Terminus die Histonfaltungs-Domäne, über die die Histon-Histon und Histon-DNA Interaktion erfolgt, und ein stark geladenes N-terminales Ende, das sehr

Lysin-reich ist (Arents et al., 1991). Eukaryotische Zellen enthalten ein weiteres fünftes Histon H1, das auch Linker-Histon genannt wird. Dieses Histon bindet die DNA am Ein- bzw. Austritt der DNA in bzw. aus dem Nukleosom in der sogenannten Linker Region. Zusätzlich wurde ein spezialisiertes Linker-Histon aus Huhn-Erythrocyten identifiziert, das H5 genannt wird (Ramakrishnan et al., 1993). H1 und H5 sind beide ebenfalls wie die „core“-Histone stark basische, Lysin-reiche Proteine.

Spezifische Aminosäuren der N-terminalen Enden der „core“-Histone werden durch Kofaktoren posttranslational modifiziert (Kuo et al., 1996). Die zwei wichtigsten posttranslationalen Modifikationen der Histone sind die Acetylierung und die Phosphorylierung. Die Acetylierung der N-terminalen Enden der „core“-Histone spielt in der Transkriptionsaktivierung eine entscheidende Rolle. So konnte gezeigt werden, daß durch die Zugabe des Histon-Deacetylase Inhibitors Natrium Butyrat, was eine deutliche Zunahme der gesamten Histon Acetylierung bewirkte, die DNA für DNase I zugänglicher wurde und so die Transkription auf transfizierter Plasmid DNA stimuliert wurde (Gorman et al., 1983). Weiterhin lassen Experimente mit spezifischen Antikörpern gegen acetylierte Histone vermuten, daß die „core“ Histone von frisch transkribierter DNA stärker acetyliert vorliegen als die Histone von inaktiven DNA-Bereichen (Lin et al., 1989). Da außerdem das transkriptionell inaktivierte X-Chromosom in weiblichen Säugetieren keine Acetylierung des Histons H4 aufweist (Jeppesen and Turner, 1993) und da einige transkriptionelle Koaktivatoren Histonacetylase (HAT) Aktivitäten und einige Korepressoren Deacetylaseeigenschaften zeigen (Bannister and Kouzarides, 1996; Ogryzko et al., 1996; Laherty et al., 1997; Nagy et al., 1997), ist eine Beteiligung des Acetylierungslevels an der Transkriptionsregulation durch eine Erhöhung der Zugänglichkeit der DNA für Transkriptionsfaktoren wahrscheinlich.

Für die Regulation der Transkriptionsrate auf chromatinverpackter DNA spielt neben der Acetylierung der Histone auch die Reorganisation der Nukleosomen durch Remodellingkomplexe eine große Rolle (Felsenfeld 1996; Workman and Kingston 1998). Der erste entdeckte Remodelling Komplex war der 11 Untereinheiten große SWI/SNF Komplex in Hefe (Cairns et al., 1994; Peterson et al., 1995). In Drosophila sind einige verwandte Remodelling Komplexe identifiziert worden, die NURF (nucleosome-remodelling factor), CHRAC (chromatin accessibility complex) und ACF (ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor) genannt werden (Tsukiyama and Wu, 1995; Varga-Weisz et al., 1997; Pazin et al., 1997). All diese Proteinkomplexe erleichtern durch ihre ATP abhängigen Remodelling-Aktivitäten den Zugang von Transkriptionsfaktoren an die nukleosomal verpackte DNA und wirken so transkriptionsaktivierend.

1.3 Die Domänenstruktur der Steroidhormon-Rezeptoren

Proteine der Kernrezeptor (NR) Familie, von denen viele mit lipophilen Hormonen interagieren, regulieren die Differentiation, die Entwicklung, die Homeostasis und das Verhalten durch die direkte Regulation von Zielgenen. Zu den NR gehören unter anderem die Steroidrezeptoren (SR), zu denen der Progesteron-Rezeptor (PR) und der Östrogen-Rezeptor (ER) zu zählen sind, die Orphan-Rezeptoren, die Thyroid- und Retinoid-Rezeptoren und der HNF-4 (hepatocyte nuclear factor 4) Rezeptor (Tsai and O'Malley, 1994). Alle NR weisen eine vergleichbare konservierte Domänenstruktur auf, die in sechs Regionen (A bis F) unterteilt wird (Krust et al., 1986; Tsai and O'Malley, 1994; Green and Chambon, 1986). Die größten Sequenzunterschiede der NR-Familie untereinander sind im Aminoterminal, welcher auch als A/B Domäne bezeichnet wird, zu finden. Von der A/B Domäne konnte gezeigt werden, daß sie, fusioniert an eine heterologe DNA-Bindedomäne, eine konstitutive Aktivierungsfunktion enthält, die auch als AF-1 bezeichnet wird (Giguere et al., 1986; Kumar et al., 1987; Hollenberg and Evans, 1988). Die Größe der A/B Region ist dabei sehr variabel, wobei diese Region bei den SR mehrere hundert Aminosäuren umfaßt. Die C-Region, die reich an Cystein und basischen Aminosäuren ist, ist die am besten konservierte Region der NR. Ihre Funktion ist die spezifische Bindung der DNA-Elemente, wobei die Bindung der DNA über zwei putative C₂C₂-Zinkfinger motive stattfindet (Evans, 1988; Luisi et al., 1991; Freedman, 1992). Zusätzlich zu der DNA bindenden Aktivität besitzt diese Domäne im Fall des Progesteron-Rezeptors, möglicherweise auf Grund der Interaktion mit TAF110, eine dritte Aktivierungsfunktion (AF-3) (Schwerk et al., 1995). Carboxyterminale, die C Domäne flankierende Sequenzen, sind zudem für die DNA-Bindung notwendig (Mader et. al., 1993). Die D-Region, die auch wegen der Lage zwischen der DNA-Bindedomäne und der Ligand-Bindedomäne „hinge“-Domäne genannt wird, ist relativ kurz und unter den Rezeptoren nicht so hoch konserviert. Die konservierte E-Domäne ist für die Dimerisierung und vor allem für die durch den spezifischen Liganden (Hormon) bewirkte Transaktivierung durch die Aktivierungsfunktion 2 (AF2) entscheidend (Evans, 1988; Tsai and O'Malley, 1994). Am Carboxyterminus liegt in einigen NR noch die F Region, deren Funktion bisher noch nicht genau bestimmt worden ist.

1.4 Die Transaktivierung durch die Steroidhormon-Rezeptoren

Im inaktiven Zustand wurde von den SR gezeigt, daß diese nicht DNA binden können und sie sich gebunden an Hitzeschockproteinen und anderen Chaperonen im Cytoplasma oder im Zellkern befinden (Pratt et al., 1988; Smith and Toft, 1993; Pratt, 1993; Bohen, 1995; Kahmann et al., 1998). Die Induktion der SR erfolgt durch die Bindung von Steroidhormonen, die von endokrinen Zellen in die Blutbahn sezerniert werden und durch passiven oder aktiven Transport in die Zellen gelangen (Tsai and O'Malley, 1994). Die Bindung des Liganden bewirkt eine Konformationsänderung und eine Phosphorylierung des Rezeptors, der sich daraufhin von den Chaperonen trennt und als Homodimer an die responsiblen Elemente in der Nähe der Promotoren von Zielgenen bindet (Bohen et al., 1995; DeMarzo et al., 1991; Sheridan et al., 1989; Orti et al., 1992), wobei es sich bei den von den SR erkannten responsiblen Elementen um imperfekte, invertierte palindromische DNA-Sequenzen handelt (von der Ahe et al., 1985; Strahle et al., 1987; Klein-Hitpass et al., 1988; Klein-Hitpass et al., 1989; Cato et al., 1988). Gebunden an die responsiblen Elemente bewirken die SR eine Aktivierung der Transkription der entsprechenden Zielgene. Mehrere Mechanismen spielen bei der Transaktivierung durch die Steroidrezeptoren eine Rolle. Da SR in der Lage sind die Transkription auf minimalen Promotoren zu aktivieren, scheint es zu Interaktionen zwischen den SR und der Transkriptionsmaschinerie zu kommen, wobei diese Interaktionen eine Stabilisierung des Präinitiations Komplexes (PIC) bewirken (Klein-Hitpass et al., 1990; Tsai et al., 1990). Eine direkte Interaktion zwischen verschiedenen NR und Proteinen des PIC konnte für TFIIB, TFIIF, TFIIF, TBP, TAFII30 und TAFII110 gezeigt werden. (Ing et al., 1992; Jacq et al., 1994; Schwerk et al., 1995). Da in Überexpressionsstudien die Aktivität des PR durch die gleichzeitige Koexpression des ER herabgesetzt wird (Meyer et al., 1989), lag die Vermutung nahe, daß beide transfizierten Rezeptoren gleiche in limitierenden Konzentrationen vorliegende Proteine rekrutieren, was für eine Beteiligung von Kofaktoren an der Transaktivierung der SR sprach. In Protein-Protein-Interaktionsanalysen wurden inzwischen tatsächlich zahlreiche Kofaktoren auf Grund ihrer Wechselwirkung mit den Kern-Rezeptoren identifiziert (Cavaillès et al., 1995; Halachmi et al., 1994; Eggert et al., 1995; Onate et al., 1995; Zeiner and Gehring, 1995; Hong et al., 1996; Muller et al., 2000; Castillo et al., 1999; Rachez et al., 1999; Blanco et al., 1998).

Die cDNA des Steroid Rezeptor Koaktivators 1 (SRC-1) konnte in einem Hefe Interaktionsscreen identifiziert werden (Onate et al., 1995). SRC-1 interagiert hormonabhängig sowohl mit der Ligandenbindedomäne des PR, wie auch mit den Ligandenbindedomänen einiger anderer NR, wie z.B. mit der des ER, des GR oder des TR. Weiterhin ist SRC-1 in der Lage, die oben beschriebene Interferenz in Überexpressionsstudien zwischen Östrogen- und Progesteron-Rezeptor aufzuheben,

was eine Beteiligung von SRC-1 an der Transaktivierung sowohl des ER als auch des PR vermuten läßt (Onate et al., 1995). Mehrere Labore identifizierten unabhängig voneinander SRC-1 ähnliche Koaktivatoren, wie z.B. SRC-2/TIF2 (transcriptional intermediate factor-2)/ NcoA-2 (nuclear receptor coactivator-2) oder SRC-3/ p/Cip (p300/CBP cointegratorprotein)/RAC-3(receptor associated coactivator 3)/AIB-1 (amplified in breast cancer-1) (Hong et al., 1996; Voegel et al., 1996; Anzick et al., 1997; Li et al., 1997; Takeshita et al., 1997; Torchia et al., 1997; Suen et al., 1998). Die Mitglieder dieser SRC Familie weisen Sequenzhomologien untereinander auf und sind alle in einer vergleichbaren Domänenstruktur organisiert. Weiterhin enthalten diese Kofaktoren mehrere Transaktivierungsfunktionen und NR Interaktionsdomänen (Chen et al., 1997). Die Sequenzvergleiche aller SRC Familienmitglieder zeigen eine Übereinstimmung von 40 %, wobei die größte Homologie am N-Terminus, der die PAS/bHLH Domäne enthält, zu finden ist. Weiterhin enthalten alle SRC Proteine LXXLL Motive (L=Leucin und X= jede andere Aminosäure), die für die Interaktion mit der Ligand gebundenen AF-2 der NR notwendig sind und als „nuclear receptor“-Boxen (NR-Boxen) bezeichnet werden (Heery et al., 1997).

Sowohl SRC-1 als auch SRC-3 enthalten im carboxyterminalen Teil eine Histon Acetylase Aktivität (HAT) (Chen et al., 1997; Spencer et al., 1997). Von allen Mitgliedern der SRC Familie konnte weiterhin gezeigt werden, daß sie direkt oder indirekt mit CBP/p300 und dem p300/CBP-assoziierten Faktor (PCAF), die beide HAT Aktivität zeigen, interagieren (Bannister and Kouzarides 1996; Ogryzko et al., 1996; Voegel et al., 1998). Die Anzahl der Koaktivatoren, die HAT Aktivität zeigen läßt vermuten, daß die Acetylierung der Histone einen wichtigen Mechanismus der Aktivierung durch die Kofaktoren darstellt. Die Acetylierung der Histone durch diese Kofaktoren bewirkt eine Auflockerung der Chromatinstruktur in der Umgebung der NR und erleichtert so die Bildung des PIC Komplexes (Gorman et al., 1983). Jedoch ist die Acetylierung der Histone nicht der einzige Aktivierungsmechanismus der SRC Proteine, da SRC-1 in in-vitro Transkriptionsreaktionen auch auf nicht Chromatin verpackten Templates PR abhängige Transaktivierung zeigt (Liu et al., 1999).

Der Multiproteinkoaktivator-Komplex TRAP (TR-associated proteins) bzw. DRIP (VDR-interacting proteins) wurde von 2 Gruppen unabhängig voneinander identifiziert (Fondell et al., 1996; Rachez et al., 1998). Dieser aus 10 Proteinen bestehende Komplex, von dem einige Proteine NR-Boxen enthalten, verstärkt die TR vermittelte Transaktivierung in vitro in einem Chromatin freien System (Yuan et al., 1998; Ito et al., 1999; Zhang and Fondell, 1999). Da der DRIP/TRAP Komplex nicht nur als Koaktivator für NR, sondern auch bei anderen Transkriptionsfaktoren, wie z.B. p53, VP16, SREBP-1a und SP1 (Ito et al., 1999; Naar et al., 1999), transkriptionsaktivierend wirkt, scheint dieser Komplex als genereller Kofaktor für viele unterschiedliche

Transkriptionsfaktoren zu wirken.

Ein Kofaktor des PR, COPRA (cofactor of PR activation), konnte durch säulenchromatographische Methoden aus Rattenleber-Kernextrakt angereichert werden (Klotzbücher et al., 1997). Obwohl die genaue Sequenz und Struktur dieses Kofaktors nicht bekannt ist, konnte in einem rekonstituierten in-vitro Transkriptionssystem eine PR abhängige Transaktivierung festgestellt werden. Durch Verwendung einer C-Terminal deletierten PR Mutante wurde außerdem gezeigt, daß auch für die Wirkung dieses Kofaktors die AF-2 des PR notwendig ist (Klotzbücher et al., 1997; Abb. 6A), da eine C-Terminal deletierte Progesteron-Rezeptor Mutante COPRA unabhängig in der in-vitro Transkription aktivierte.

1.5 Der Aufbau der Mikrotubuli

Der Transport von Proteinen, die durch die Verwendung der im Kern erstellten mRNA als Matrize von der Translationsmaschinerie im Cytoplasma erstellt werden, läuft unter anderem an den Mikrotubuli entlang. Mikrotubuli sind nichtverzweigende Hohlzylinder aus α - und β -Tubulin Untereinheiten mit einem Durchmesser von ca. 20-25 nm. Die Wand dieser Zylinder ist ca. 5 nm dick und besteht aus 13 im Kreis angeordneten Proteinen, die zusammen als Protofilament bezeichnet werden. Die Tubulindimere polymerisieren in einer Kopf-Schwanz-Anordnung, wobei jedes α -Tubulin eines Dimers mit einem β -Tubulin des nächsten Dimers interagiert. Die Mikrotubuli enthalten ein Plus- und ein Minusende, welche sich in den Wachstumseigenschaften stark unterscheiden (McIntosh and Euteneuer, 1984). Das Plusende zeigt schnelles Wachstum und schnellen Abbau, wohingegen das Minusende, das häufig am Centrosom gebunden ist, wesentlich stabiler zu sein scheint und sich kaum verändert (Desai and Mitchison, 1998). Die Mikrotubuli spielen in mehreren zellulären Prozessen, wie z.B. bei der Zellfortbewegung, beim intrazellulären Transport von Proteinen und Zellorganellen durch Kinesin- und Dynein-Motorkomplexe (Kull et al., 1996; Gill et al., 1991), bei der Auftrennung der Chromosomen während der Mitose auf die beiden Tochterzellen und bei der Zellmorphologie eine große Rolle.

1.6 Der Aufbau und die Wirkungsweise des Centrosoms

Das Centrosom, das in Interphasenzellen häufig in der Nähe des Zellkerns zu finden ist, stellt das wichtigste Mikrotubuli Organisations Center (MTOC) der tierischen Zelle dar (Desai and Mitchison, 1998). Es besteht aus 2 Centriolen, die in der sie umgebenden pericentriolaren Matrix (PCM) eingebettet sind (Dictenberg et al., 1998; Mignot, 1996; Bergen et al., 1980). Aufgebaut sind die ca. 200 nm breiten und ca. 400 nm langen zylindrischen Centriolen aus neun Triplets von Mikrotubuli, die parallel der Längsachse des Organells angeordnet sind (Mignot, 1996, Dictenberg et al., 1998). In den meisten menschlichen Zellen liegen die beiden Centriolen im rechten Winkel orthogonal zueinander, wobei den Centrinen eine wichtige Bedeutung bei der Orientierung der beiden Centriolen zueinander und zu dem Zellkern hin zufällt (Taillon et al., 1992; Wright et al., 1985). Die centriolaren Mikrotubuli sind im Gegensatz zu den cytoplasmatischen Mikrotubuli durch posttranslationale Modifikationen vorzugsweise an α -Tubulin polyglutaminiert, was möglicherweise die große Stabilität der Centriolen im Vergleich zu den nicht polyglutaminierten Mikrotubuli erklärt (Bobinnec et al., 1998). Die genaue Funktion der Centriolen ist bisher nicht eindeutig bestimmt. Da die Drosophila Zelllinie 1182-4 keine Centriolen enthält, die Zellen jedoch trotzdem normales Wachstum zeigen (Debec and Abbadie 1989; Szöllösi et al., 1986) und höhere Pflanzen und auch Pilze keine Centriolen enthalten, scheinen Centriolen nicht für alle Zelltypen essentiell zu sein (Picket-Heaps, 1971). Im Gegensatz hierzu stehen einige Experimente, die verdeutlichen, daß die Centriolen eine entscheidende Rolle für die Funktion des Centrosoms in Zellen spielen. So konnten Zellen, bei denen durch Mikromanipulationen die Centriolen entfernt wurden, nicht mehr in die Mitose gelangen (Maniotis and Schliwa, 1991). Außerdem hatten Injektionen in HeLa-Zellen mit Antikörpern gegen centriolares polyglutaminiertes α -Tubulin zur Folge, daß die Centriolen depolymerisierten und die Organisation der pericentriolaren Matrix zerstört wurde (Bobinnec et al., 1998), was eine Beteiligung der Centriolen an der gesamten Organisation des Centrosoms vermuten läßt.

Die pericentriolare Matrix wird hauptsächlich von Pericentrin und Hunderten runder, ringförmiger Strukturen von ca. 25 nm Durchmesser, den γ -Tubulin-Ring Komplexen (γ -TuRC) gebildet (Dictenberg et al., 1998; Moritz et al., 1995; Vogel et al., 1997). Weiterhin enthält die pericentriolare Matrix einige sehr große Proteine, die häufig „Coiled-coil“-Struktur motive aufweisen. Die genaue Funktion dieser Proteine ist bisher nicht bekannt, jedoch läßt ihre Größe darauf schließen, daß sie mehrere Funktionen inne haben. Einige dieser großen centrosomalen Proteine zeigen auf DNA Ebene zudem eine exzessive Exon-Intron Struktur, was eine große Anzahl

von „splice“-Varianten vermuten läßt, die unterschiedliche Funktionen ausüben können. Zu diesen centrosomalen Proteinen zählen Pericentrin (Doxsey et al., 1994), das mit den γ -TuRCs in Verbindung gebracht wird, und das humane Homolog Kendrin (Flory et al., 2000). Auch AKAP450, das von mehreren Laboren unabhängig voneinander kloniert wurde, ist ein etliche „Coiled-coil“-Domänen enthaltendes centrosomales Protein von über 3900 Aminosäuren, das in vielen „splice“-Varianten vorliegt (Schmidt et al., 1999; Takahashi et al., 1999; Witczak et al., 1999).

Aufschluß über die Funktion der γ -TuRCs erhielt man durch die Behandlung von präparierten Centrosomen mit Kaliumiodid, wobei Centrosomen entstanden, die keine Mikrotubuli mehr binden konnten (Moritz et al., 1998; Schnackenberg et al., 1998). Elektronenmikroskopische Aufnahmen verdeutlichten, daß diese Kaliumiodidbehandlung zu einem Verlust der ringförmigen γ -TuRC führte (Schnackenberg et al., 1998). Diese nicht mehr zur Mikrotubulibindung fähigen Centrosomen konnten durch die Inkubation mit Drosophila-Embryo-Extrakten wieder aktiviert werden, was mit dem elektronenmikroskopisch beobachteten, erneuten Auftreten von γ -TuRC korrelierte (Schnackenberg et al., 1998). Da eine Behandlung der inaktivierten Centrosomen mit an γ -TuRC immuno-depletierten Drosophila Embryo Extrakten keine Reaktivierung bewirkte, jedoch eine Zugabe der γ -TuRC zu diesem Ansatz die Mikrotubulibindungsfähigkeit des Centrosoms wieder herstellte, scheinen die γ -TuRC essentiell für die Mikrotubuli-Nukleation der Centrosomen zu sein (Moritz et al., 1998). Obwohl das Cytoplasma ebenfalls große Mengen an γ -TuRC (Moritz et al., 1995; Oegema et al., 1999; Vogel et al., 1997; Zheng et al., 1995) enthält, sind die cytoplasmatischen γ -TuRC, die auch als Gammasomen bezeichnet werden (Stearns and Kirschner, 1994), nicht in der Lage Mikrotubuli zu binden. Dieser Pool an cytoplasmatischen γ -TuRCs erlauben es wahrscheinlich der Zelle, diese γ -TuRC schnell am Centrosom zu rekrutieren und so die Anzahl der Mikrotubulibindungen am Centrosom ohne die Neusynthese von Proteinen schnell zu erhöhen (Raff et al., 1993; Stearns and Kirschner, 1994). Neben γ -Tubulin (Oakley and Oakley, 1989), das in ca. 10-15 Molekülen pro γ -TuRC vorliegt, wurden bisher folgende Untereinheiten der γ -TuRC gefunden: Drosophila Dgrip84 und Dgrip91 (Oegema et al., 1999), humanes hGCP2 und hGCP3/HsSpc98 (Murphy et al., 1998; Tassin et al., 1998) und Xenopus Xgrip109 (Martin et al., 1998). Auf Grund der Sequenzhomologien können Dgrip91, hGCP3 und Xgrip109 zu einer Genfamilie und Dgrip84 und hGCP2 zu einer weiteren Genfamilie gezählt werden. Die genauen Mechanismen der Mikrotubuli-Nukleation durch die γ -TuRC sind bisher nicht bekannt, jedoch gibt es zwei unterschiedliche Hypothesen (Oakley et al., 1990; Zheng et al., 1995; Erickson and Stoffler, 1996). Der erste Erklärungsansatz, der von Oakley et al., 1990 aufgestellt und von Zheng et al.,

1995 erweitert wurde, besagt, daß der γ -TuRC als Template für die Polymerisation der Mikrotubuli am Centrosom wirkt. Postuliert wird in diesem Modell, daß die α - und β -Tubulin Dimere eine größere Affinität zu den γ -Tubulinen des γ -TuRC als zueinander haben. Die Tubulindimere binden somit den γ -TuRC und bilden so die erste Schicht von Tubulindimeren, auf die weitere Schichten Tubulindimere assemblieren und so die Mikrotubuli bilden.

Das zweite von Erickson und Stoffler 1996 aufgestellte Modell wird als Protofilament-Nukleations Modell bezeichnet. Hierbei wird angenommen, daß jedes γ -Tubulin eines γ -TuRC miteinander in Kopf-Schwanz-Richtung interagiert und so ein gewundenes Protofilament bildet. Dieses Modell setzt voraus, daß die Nukleationsaktivität von den γ -TuRC Komplexen nicht durch die Ringstruktur bedingt ist, sondern vielmehr, daß der Ringkomplex aufbricht und so als Vorläuferprotofilament wirkt, an den sich die α - und β -Tubulindimere durch laterale und longitudinale Interaktion mit γ -Tubulin anlagern.

Im Laufe des Zellzyklus verdoppeln sich die Centriolen, so daß die neu entstehenden Tochterzellen ebenfalls ein komplettes Paar Centriolen enthalten. Eine gleichmäßige Verteilung der Chromosomen auf die beiden Tochterzellen während der Mitose ist von der Bildung einer bipolaren Spindel in beiden Tochterzellen abhängig. Somit ist offensichtlich, daß die Centriolen-Duplikation und die Reifung der Centriolen klar in den Zellzyklus der Zelle integriert sein müssen. (Sluder and Hinchcliffe, 1998, 2000). Falls es nicht zu einer Verdoppelung des Centrosoms beim Start der Mitose kommt, gelangt die Zelle ohne sich zu teilen in die Interphase zurück und wird so polyploid. Wenn das Centrosom jedoch mehr als einmal dupliziert wird, wird eine multipolare Spindel gebildet, und die Chromosomen teilen sich nicht gleichmäßig auf die Tochterzellen auf. Obwohl Tochterzellen mit einem abnormalen Chromosomensatz häufig nicht lebensfähig sind, können so auch Tochterzellen gebildet werden, bei denen Chromosomen mit Tumorsuppressorgenen fehlen, oder Tochterzellen, bei denen wachstumsfördernde Gene zu häufig in der Zelle vorkommen. Solche Zellen, die in einigen genetisch instabilen humanen Tumoren zu finden sind, zeigen häufig aggressives Wachstum und eine anormal hohe Zahl von Centrosomen (Pihan et al., 1998; Lingle et al., 1998; Brinkley and Goepfert, 1998).

Das erste erkennbare Ereignis der Verdoppelung der Centriolen ist in der G1 Phase zu erkennen, wenn die orthogonal zueinander liegenden Centriolen ihre Orientierung verlieren und den Abstand zueinander vergrößern (Hinchcliffe et al., 1998). In der frühen S-Phase ist eine kleine Struktur, die Procentriole genannt wird, am Ende jeder Centriole zu erkennen. Diese Procentriolen, die im rechten Winkel zu ihren Elterncentriolen angeordnet sind, verlängern sich im Laufe der S und der frühen G2 Phase, und ab dem Übergang von der G2 in die M Phase ist die Reifung der neuen

Centriolen abgeschlossen (Lange and Gull, 1995). Die duplizierten Centriolen wandern nun zu den gegenüberliegenden Seiten des Zellkerns, wobei diese Wanderung von Kinesin ähnlichen Mikrotubuli-Motorproteinen abhängig ist (Llamazares et al., 1991; Ohkura et al., 1995; Adams et al., 1998). Sobald sich die Membran des Zellkerns im Laufe des Zellzyklus auflöst, interagieren von den Centrosomen ausgehende Mikrotubuli mit den Chromosomen und bilden zusammen mit den überlappenden Mikrotubuli des gegenüberliegenden Pols die bipolare Spindel. Durch die Trennung der Chromosomen und der anschließenden Cytokinese bilden sich zwei Tochterzellen, die jeweils ein Centrosom enthalten.

Wie die Centrosomduplizierung reguliert wird, ist bisher noch nicht in allen Einzelheiten geklärt. Ein Regulationsmechanismus dieses Prozesses scheint jedoch über extrazelluläre Signale zu laufen. Der Wachstumsfaktor EGF spielt hierbei eine entscheidende Rolle, da sich die Centriolen von Zellen, die in Serum-freien Medium gehalten werden, erst nach der Zugabe des Wachstumsfaktors EGF trennen, wobei diese Trennung den ersten Schritt der Centrosomverdoppelung darstellt (Sherline and Mascardo 1982, 1984). Außerdem konnte in durch Hydroxyurea in der frühen S-Phase arretierten CHO Zellen durch die Zugabe von EGF die Centrosomduplizierung von der Verdoppelung der DNA abgekoppelt werden (Balczon et al., 1995). An dem zellulären Signalweg, über den die Aktivierung der Centriolenverdoppelung durch die Rezeptorstimulation erfolgt, sind wahrscheinlich cyclin/cdk2 Komplexe beteiligt (Hinchcliffe et al., 1999; Lacey et al., 1999; Matsumoto et al., 1999; Meraldi et al., 1999). Die Abhängigkeit der Centriolenduplizierung und der Centriolenreifung von der Aktivierung von cdk2 konnte in Xenopuseiextrakt, in Xenopus Zellen und in Säugetierzellen aufgezeigt werden (Hinchcliffe et al., 1999; Lacey et al., 1999; Matsumoto et al., 1999; Meraldi et al., 1999). Wahrscheinlich werden in der frühen G1 Phase als Antwort auf die EGF Stimulation mehrere Kinasen aktiviert und so die ersten Schritte der Centrosomverdoppelung gestartet. Unterstützt wird diese Theorie dadurch, daß am Centrosom einige Kinasen- und Phosphatasen-Proteine lokalisiert sind (Brinkley and Goepfert, 1998). Da wahrscheinlich durch Kinasen die Duplizierung des Centrosoms gesteuert wird, sollten ebenfalls Phosphatasen für die Abschaltung des Duplizierungssignals notwendig sein. Einen weiteren Hinweis auf die Beteiligung von Kinasen und Phosphatasen erhielt man durch Phosphataseinhibitor-Experimente, da die Zugabe eines Phosphataseinhibitors zu verschiedenen Zelltypen eine Überproduktion von Centrosomen zur Folge hatte (Cheng et al., 1998). Zudem ist bekannt, daß die Serin-Threonin Kinase Nek2 centrosomal lokalisiert vorliegt und daß diese an der Regulation der Spaltung der Centriolen, was den ersten Schritt der Centrosomverdoppelung darstellt, beteiligt ist (Fry et al., 1995, 1998). Auch der Tumorsuppressor p53 ist an der Regulation beteiligt, da p53 ^{-/-} Mäuse verstärkt zur Überproduktion von Centrosomen neigen (Fukasawa et al., 1996).

1.7 Das Centrosom in der Spermiogenese

In den meiotischen Teilungen reduziert sich die genomische DNA der Gameten um die Hälfte, so daß beide Eltern einen gleichen Anteil genomischen Materials beisteuern und eine diploide Zygote entstehen kann. Neben dem eigentlichen Genom ist das Centrosom während der Befruchtung entscheidend, da es eine wichtige Rolle für die Anordnung des elterlichen Genoms durch die Mikrotubuliaster spielt und auch in den nachfolgenden Zellteilungsschritten für eine gleichmäßige Aufteilung der DNA sorgt. Zygoten müssen somit immer eine korrekte Anzahl an Centrosomen enthalten. Eine unvollständige Kontrolle der Centrosomenanzahl bewirkt entweder ein Fehlschlagen der Befruchtung oder eine anormale embryonale Entwicklung (Simerly et al., 1995; Palermo et al., 1997). Obwohl männliche und weibliche Gameten den gleichen Satz an Chromosomen bei der Befruchtung beisteuern, werden die Centrosomen nicht gleichmäßig von beiden Elternteilen weitergegeben, da die Zygote somit zwei Centrosomen enthalten würde.

Übereinstimmend mit diesen Überlegungen kann in Oocyten von diversen unterschiedlichen Lebewesen, wie z.B. Fröschen (Huchon et al., 1981), *Drosophila* (Mahowald and Strassheim, 1970), Hühnern (Greenfield, 1966), Kühen (Sathananthan et al., 1997) und auch im Menschen (Hertig and Adams, 1967) eine Degradation der Centriolen festgestellt werden, wohingegen im Spermium von *Xenopus* (Bernardini et al., 1986), Kaninchen (Zamboni and Stefanini 1971), Schaf (Le Guen and Crozet, 1989), Affen (Zamboni and Steffanini, 1971) und auch im Menschen die Centriolen erhalten bleiben. Im Gegensatz dazu werden die Centriolen in Spermien aus Nagetieren ebenfalls wie bei den Oocyten vollständig abgebaut (Woolley and Fawcett, 1973, Manandhar et al., 1998). Die Centrosomen in Oocyten degradieren jedoch nicht vollständig, denn obwohl die Centrosomen in Oocyten keine Centriolen mehr enthalten, behalten sie weiterhin MTOC Funktionen während der Meiose (Schatten et al., 1989). Die Oocyten enthalten außerdem einen großen Vorrat an centrosomalen Proteinen (Holy and Schatten, 1991; Schatten et al., 1992; Palacios et al., 1993; Merdes et al., 1996), der für die Bildung von ca. 1000-2000 aktiven Centrosomen ausreicht (Gard et al., 1990). Im Gegensatz dazu verlieren die Spermien, obwohl sie die Centriolen behalten, einen Großteil der centrosomalen Proteine (Sutovsky et al., 1999).

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Um die Wirkungsweise des Progesteron-Rezeptors genauer verstehen zu können, sollen im Rahmen dieser Dissertation zwei putative Kofaktoren des Progesteron-Rezeptors analysiert und charakterisiert werden.

So soll der Kofaktor COPRA (cofactor of PR activation), der von Dr. Klotzbücher 1997 in unserer Arbeitsgruppe durch säulenchromatographische Methoden aus Rattenleber-Kernextrakt angereichert worden ist, weiter aufkonzentriert und charakterisiert werden. Zur Identifizierung und Funktionsanalyse von COPRA haltigen Fraktionen wird das von Dr. Klotzbücher aufgestellte, rekonstituierte, Kofaktor limitierende in-vitro Transkriptionssystem verwendet. In diesem rekonstituierten in-vitro Transkriptionssystem kann mit Hilfe eines im Baculovirussystem rekombinant erstellten PR die PR-abhängige, transaktivierende Wirkung von angereicherten COPRA haltigen Fraktionen analysiert werden. Weiterhin kann in diesem System, durch den Einsatz von rekombinant erstellten Progesteron-Rezeptor Deletions- und Mutationsproteinen, der Bereich des PR bestimmt werden, der für die COPRA Aktivierung verantwortlich ist. Da von mehreren Kofaktoren, unter anderem auch von SRC-1 (Onate et al., 1995), gezeigt wurde, daß diese auch durch ihre Histonacetylase-Funktion transkriptionsaktivierend wirken, soll außerdem die Wirkungsweise von COPRA in einem neu zu etablierenden in-vitro Chromatin-Transkriptionssystem getestet werden.

In dem zweiten zu behandelnden Projekt soll die von Dr. Schwerk 1996 in einem Hefe Interaktionsscreen gefundene, hormonabhängig mit dem PR interagierende 114-2 cDNA Sequenz, die von Dr. Michels in 5'- und 3'-Richtung verlängert wurde und möglicherweise für einen Kofaktor des PR kodiert, zu einem vollständigen cDNA Klon verlängert werden. Durch Datenbankrecherchen sollen weiterhin die chromosomale Lokalisation, die Intron-Exon Struktur und bekannte Sequenzelemente analysiert werden. In Northernblot- und RT-PCR Analysen soll die RNA Expression in unterschiedlichen Zelllinien und unterschiedlichen Ratten-Geweben untersucht werden. Mit Hilfe von spezifischen, affinitätsgereinigten Antikörpern soll in Westernblot-Analysen das Protein nachgewiesen und in Immunfluoreszenzanalysen die zelluläre Lokalisation des Proteins mit Hilfe des konvokalen Laser Scan Mikroskops identifiziert werden. Durch die Überexpression von Vollängen- und Deletionskonstrukten sollen außerdem in Immunfluoreszenzanalysen die für die zelluläre Lokalisation notwendigen Domänen bestimmt werden.

2 Materialien und Methoden

Molekularbiologische Standardtechniken zur Modifikation und Rekombination von DNA und dazu notwendige Lösungen und Rezepte wurden entweder bekannten Methodensammlungen (Sambrook et al., 1989; Ausubel et al., 1991) oder unverändert der zitierten Literatur entnommen und werden deshalb nicht beschrieben.

2.1 Chemikalien und Enzyme

Eingesetzt wurden Chemikalien und Enzyme folgender Bezugsquellen: Amersham-Pharmacia (Freiburg), Bio-Rad (München), Biozym (Hameln), Roche (Mannheim), Difco Laboratories (Detroit, USA), Eurogentec (Seraing, Belgien), Fluka (Neu-Ulm), GeneCraft (Münster), Gibco BRL (Eggenstein), Invitrogen (Leek, Niederlande), MBI Fermentas (Vilnius, Litauen), Merck (Darmstadt), MolecularProbes (Leiden, Niederlande), Pierce (Oud Beijerland, Niederlande), Promega (Madison, USA), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma (München) und Stratagene (La Jolla, USA).

2.2 Bakterien und Bakterienkultur

Für die Amplifizierung rekombinanter DNA wurde der Bakterienstamm E. coli RRI (F^- , $hsd20$ (r_B^- , m_B^-), $supE44$, ara 14, gal -2, lac Y1, pro A2, rec A $^+$) verwendet.

Für die Expression von Fusionsproteinen wurden die E. coli Stämme RRI und BL21 DE3 $plysS$ (CM r) verwendet.

Die Anzucht der Bakterien erfolgte auf LB-Agar bzw. in LB-Medium unter Zugabe des für die Selektion benötigten Antibiotikums (Ampicillin, Kanamycin).

2.2.1 Transformation von E. Coli

Zur Transformation von Plasmid DNA wurden 1-2 μ l des Ligationsansatzes bzw. eine geeignete Verdünnung des Plasmids mit 40 μ l der elektrokompenten RRI Bakterien auf Eis gemischt. Die Elektroporation erfolgte in vorgekühlten 1 mm Küvetten mit 1,5 kV, 25 mA, 50 μ F, 150 Ω . Nachdem die Bakterien 30 – 45 min bei 37 °C in 1 ml LB-Medium inkubiert wurden, wurden 100 – 200 μ l des Ansatzes auf Selektivmedien ausplattiert.

Für die Transformation in BL21 DE3 $plysS$ wurden 100 μ l Calcium-kompetenter Bakterien mit 50 – 200 ng Plasmid DNA auf Eis gemischt und 30 min inkubiert. Es erfolgte ein einminütiger Hitzeschock bei 42 °C. Nach der Zugabe von 500 μ l LB-Medium wurden die Bakterien 30 – 45 min lang bei 37 °C inkubiert und anschließend 200 μ l auf Selektivmedium ausplattiert.

2.2.2 Präparation von Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab aus 1,5 ml Bakterienkulturen erfolgte nach der Methode der alkalischen Lyse von Birnboim und Doly (1979) wie von Ausubel et al. 1991 beschrieben.

Die Herstellung von Plasmid-DNA in größerem Maßstab (50-200 ml Bakterienkultur) erfolgte mit Hilfe der Affinitätssäulen (Tip100 und Tip500, QIAGEN) nach Herstellerangaben.

2.3 Proteinexpression

2.3.1 Expression von GST-Fusionsproteinen in E. Coli

Für die Expression von GST-Fusionsproteinen in E. coli wurde der BL21 DE3 pLys Stamm mit dem entsprechenden Expressionsplasmid transformiert. Ausgehend von einer einzelnen Kolonie wurde eine Kultur bei 37 °C zunächst in 3 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin über Nacht inkubiert, anschließend mit dieser Kultur 50 - 500 ml LB Medium mit 100 µg/ml Ampicillin angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 -1,0 aufgezogen. Die Induktion der rekombinaten Proteine erfolgte 2 Stunden bei 30 - 37 °C unter Zugabe von 0,1 mM IPTG. Nach Ernte der Bakterien durch Zentrifugation wurden diese in 5 - 20 ml NETN-Puffer resuspendiert, die Suspension mit Proteaseinhibitoren (PMSF, Benzamidin, Leupeptin, Pepstatin A) und mit DTT zu 5 mM versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Der Aufschluß der Zellen erfolgte durch Sonifizierung für 1 min. Durch Zentrifugation (12.000 g, 15 min) wurde unlösliches Material sedimentiert und der Überstand für 1 Stunde bei 4 °C mit äquilibrierter Glutathion-Sepharose 4B (Pharmacia, 100 – 500 µl der ursprünglichen Suspension) inkubiert. Nach Sedimentation der Sepharose (2 min, 1000 g) folgten zwei Waschschrte mit 5 - 20 ml NETN-Puffer und drei weitere mit 5 - 20 ml NET-Puffer. Die Elution der Proteine erfolgte durch dreimalige Inkubation der Sepharose mit 1 ml Glutathion-Elutionspuffer für 10 min.

<i>NET-Puffer:</i>	20 mM Tris/HCl pH 8 100 mM NaCl 1 mM EDTA
<i>NETN-Puffer:</i>	NET-Puffer + 0,5% NP40
<i>Glutathion-Elutionspuffer:</i>	50 mM Tris/HCl pH 8 10 mM reduziertes Glutathion

2.3.2 Transfervektoren für die Baculovirus-Expression

Die Baculovirus-Transfervektoren für die Expression der Histidin-Tag Fusionsproteine PR (MH6-hPRO) und ABΔCore (MH6-ABΔCore) sind von Schwerk et al., 1995 beschrieben worden.

2.3.3 Proteinexpression mit dem Baculovirus-System

Die Expression der PR und der PR-Deletionsmutanten in *Spodoptera frugiperda* 21 (Sf21) erfolgte wie von Zapp et al., 1993 beschrieben.

2.4 Zelllinien und Zellkultur

Für die Analysen wurden folgende Zelllinien eingesetzt: HeLa (humane Cervix-Carcinom Zellen), HeLa3B2 (stabil mit PR_B transfizierte HeLa-Zellen, s. Kahmann et al., 1998), HEK293 (humane Nierenembryozellen), HepG2 (humane Hepatoma Zelllinie), 208F/WT (Fibroblastenzelllinie von BD IX Ratten), FTO2B (Ratten Hepatoma Zelllinie), EMFI (embryonale Mausfibroblasten).

Die Zelllinien wurden in in Dulbecco's modifiziertem Eagles-Medium (DMEM) mit 10 % FCS, 100 units/ml Penicillin/Streptomycin und 1 mM Glutamin kultiviert und bei 37 °C, 7 - 7,8 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert.

2.4.1 Transiente Transfektionen

Transiente Transfektionen in HEK293 Zellen dienen der Expression von Proteinen für Westernblotanalysen, für Immunfluoreszenzanalysen oder zur Erstellung von stabil exprimierenden Zelllinien. Hierzu wurden 2 x 10⁶ Zellen in 10 cm Gewebekulturschalen abends ausgesät. Am nächsten morgen wurde Medium mit 0,1 mM Chloroquine zu den Zellen gegeben. Der Transfektionsansatz enthielt neben 10 µg der entsprechenden Plasmid-DNA noch 250 mM CaCl₂ in 500 µl HBS Puffer. Nach einer 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Transfektionsansatz auf die Zellen getropft. Nachdem die Zellen 4-5 h bei 37 °C inkubiert worden waren, wurde das Medium von den Zellen entfernt und die Zellen in je 5 ml 15 % Glycerin / 85 % PBS 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zweimaligen Waschen mit PBS wurde frisches Medium zu den Zellen gegeben und diese anschließend über Nacht bei 37 °C inkubiert.

<i>HBS-Puffer:</i>	25 mM Hepes pH 7,05
	140 mM NaCl
	5 mM KCl
	0,75 mM Na ₂ HPO ₄
	6 mM Glucose

2.4.2 Präparation von Ganzzelextrakten

Für die Präparation von Ganzzelextrakten wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, in 1 ml PBS mit einem Gummischaber von den Zellkulturschalen abgeschabt und in der Kühlzentrifuge zentrifugiert (2000 rpm, 2 °C, 5 min). Die sedimentierten Zellen wurden in Ganzzelextrakt-Puffer suspendiert und dreimal in Trockeneis eingefroren und in Eis-Wasser aufgetaut. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation in der Kühlzentrifuge (13.000 rpm, 10 min, 2 °C) sedimentiert, die Überstände abgenommen und bei -75°C gelagert.

<i>Ganzzelextrakt-Puffer:</i>	20 mM HEPES pH 7,9
	600 mM NaCl
	1 mM EDTA
	10 % Glycerin
	10 µg/ml PMSF
	2 µg/ml Pepstatin A
	2 µg/ml Benzamidin
	2 µg/ml Leupeptin

2.4.3 FACS Analyse

Die Zellen wurden mit einem Ds-Red-Fusionskonstrukt transfiziert und ein bis zwei Tage unter Kultivierungsbedingungen inkubiert. Nach dem Waschen der Zellen wurden diese in eiskaltem PBS in einer Konzentration von ca. einer Million Zellen pro Milliliter PBS aufgenommen. Durch die Zugabe von 5 μ M Hoechst 33342 wurde die DNA Fluoreszenz-markiert. Die Bestimmung der DNA Konzentration der transfizierten, leuchtenden Zellen und der nicht transfizierten Zellen erfolgte nach Herstellerangaben in dem FACS-Sorter Scan Advantage der Firma Becton and Dickinson mit dem Computerprogramm CELLquest.

2.5 Gelelektrophorese

2.5.1 Native Agarosegelelektrophorese

Die Trennung doppelsträngiger Nukleinsäuren wurde in 0,8 – 2 % Agarosegelen durchgeführt. Die Trennung erfolgte mit einer Spannung von 80 - 150 V in horizontalen Kammern in TAE Laufpuffer. Zur Detektion der Nukleinsäuren mittel UV-Licht enthielt das Gel 0,5 μ g/ml Ethidiumbromid.

TAE-Laufpuffer: 40 mM Tris/HCl pH 7,8
 20 mM Essigsäure
 1 mM EDTA

2.5.2 Denaturierende Formaldehyd-Agarosegelelektrophorese

Eine Trennung denaturierter Ribonukleinsäuren wurde in 1 % Agarosegelen mit 0,67 M Formaldehyd in horizontalen Gelkammern erzielt. Zur Denaturierung der RNA wurden die Proben in 20 μ l RNA-Probenpuffer 5 min auf 95 °C erhitzt und sofort auf Eis abgekühlt. Die Elektrophorese erfolgte in MOPS als Laufpuffer bei 150 V.

Zur Inaktivierung von RNasen wurden alle Geräte mit 1 %-iger SDS-Lösung mehrere Stunden gespült und alle wässrigen Lösungen mit DEPC-behandeltem H₂O angesetzt.

MOPS-Laufpuffer: 20 mM MOPS
 5 mM Natriumacetat
 1 mM EDTA
 auf pH 7,0 eingestellt

RNA-Probenpuffer: 50 % Formamid
 2,2 M Formaldehyd
 5 % Glycerin
 0,125 % Bromphenolblau

2.5.3 Native Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Trennung kleiner, doppelsträngiger Nukleinsäurefragmente wurden 8-10 % Polyacrylamidgele verwendet. Die Elektrophorese erfolgte in vertikalen Kammern mit TBE als Laufpuffer bei 100 - 200 V. Sichtbar gemacht wurden die getrennten Nukleinsäuren durch eine 10 min Inkubation mit 0,5 μ g/ml Ethidiumbromid in TBE und anschließender Detektion durch UV-Licht.

TBE-Laufpuffer: 100 mM Tris/HCl
 100 mM Borsäure
 2 mM EDTA

2.5.4 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese

Einzelsträngige, radioaktiv markierte Ribonukleinsäuremoleküle wurden in 6 % Polyacrylamid- / 8 M Harnstoffgelen in TBE mit einer Spannung von 0,8 - 1,4 kV getrennt. Im Anschluß an die Elektrophorese wurde das Gel mit 20 % Methanol / 10 % Essigsäure 5 min fixiert und im Membranpumpenvakuum bei 80 °C getrocknet. Die Detektion der Signale erfolgte durch Autoradiographie oder Exposition einer Bildplatte des BioImagers BAS1500.

2.5.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Die eindimensionale elektrophoretische Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen erfolgte in diskontinuierlichen Gelen nach der Methode von Lämmli (1970) mit einem Polyacrylamidanteil (PAA) von 7 % bis 12 % . Die Proben wurden hierzu in SDS-Probenpuffer (Sambrook et al., 1989) gelöst und 2 min bei 95 °C denaturiert. Die im Gel getrennten Proteine wurden durch Coomassiereagenz oder durch Silberfärbung sichtbar gemacht. Anschließend an eine Coomassie-Färbung wurde das SDS Gel in 20 % Methanol / 10 % Essigsäure in H₂O entfärbt. Zur Silberfärbung wurde das Proteingel zweifach in 10 % Essigsäure / 20 % Methanol je 30 min lang fixiert und anschließend zweifach in H₂O je 15 min gewässert. Nach einer 20 min Inkubation in 100 µM DTT wurden die Proteine mit 0,1 % AgNO₃ gefärbt und anschließend durch eine Inkubation mit Entwickler sichtbar gemacht. Gestoppt wurde die Farbreaktion durch die Zugabe von 5 ml 2,3 M Citronensäure.

Die Größe der Proteine wurde anhand geeigneter Molekulargewichtsstandards bestimmt.

<i>Coomassiereagenz:</i>	0,1% Coomassie Brilliant Blue R250 40 % Methanol 10 % Essigsäure
--------------------------	------------------------------------------------------------------------

<i>Entwickler:</i>	3 % Na ₂ CO ₃ 0,019 % Formaldehyd
--------------------	------------------------------------------------------------

2.6 Analyse von Nukleinsäuren

2.6.1 Gesamt-RNA Präparation

Die Präparation von gesamtzellulärer RNA erfolgte mit peqGOLD TriFast nach der Vorschrift des Herstellers (PeqLab).

2.6.2 Southern-Analysen

Für den Nachweis von spezifischen Sequenzen und der Größenbestimmung der sie enthaltenden DNA-Fragmente durch Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde wurde das native Agarosegel im Anschluß an die Elektrophorese jeweils 20 min mit Depurinations-, mit Denaturierungs- und dann mit Neutralisierungs-Puffer inkubiert und anschließend mit Wasser kurz gespült. In einer Kapillarblotvorrichtung (Sambrook et al., 1989) wurden die Nukleinsäuren mit 10x SSC über Nacht auf eine Nylon- Membran (Hybond N, Amersham-Pharmacia, Freiburg) transferiert

und mit 120 mJ/cm² mittels eines UV-Crosslinkers (Stratagene, La Jolla, USA) fixiert. Die weiteren Schritte (Prähybridisierung, Hybridisierung, Detektion der Signale) entsprachen der Durchführung der Northern-Analyse (siehe 2.6.3).

<i>Depurinationspuffer:</i>	1,5 M NaCl 0,5 M HCl
<i>Denaturierungspuffer:</i>	1,5 M NaCl 0,5 M NaOH
<i>Neutralisierungspuffer:</i>	1,5 M NaCl 0,5M Tris/HCl pH 8
<i>SSC:</i>	150 mM NaCl 15 mM Natriumcitrat pH 7

2.6.3 Northern-Analysen

Zur Detektion und Größenbestimmung spezifischer Sequenzen von gesamtzellulärer RNA durch Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde wurde ein denaturierendes Formaldehyd-Agarosegel zweimal für 20 min mit 10x SSC gewaschen. In einer Kapillarblotvorrichtung (Sambrook et al., 1989) wurden die Nukleinsäuren mit 10x SSC über Nacht auf eine Nylon- Membran (Hybond N, Amersham-Pharmacia, Freiburg) transferiert und mit 120 mJ/cm² mittels eines UV-Crosslinkers (Stratagene, La Jolla, USA) fixiert. Nach zweimaligem Waschen in 2x SSC wurde die Membran zur Sättigung unspezifischer Bindungsstellen eine Stunde bei 65 °C mit SDS-Hybridisierungslösung vorhybridisiert. Die Hybridisierung mit spezifischen Sonden erfolgte über Nacht bei 60 °C. Anschließend wurde die Membran bei 60 °C je einmal mit 2x SSC, 0,1 % SDS; 1x SSC, 0,1 % SDS und mit 0,5x SSC, 0,1 % SDS je 15 min gewaschen. Die Detektion der Signale erfolgte durch Autoradiographie oder Exposition einer Bildplatte des BioImagers BAS1500.

<i>SDS- Hybridisierungslösung:</i>	0,25 M NaHPO ₄ pH 7,2 1 mM EDTA 20 % SDS 0.5% Blockingreagenz 0.6
------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------

2.6.4 Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion

Für die Reverse-Transkription wurden ca. 50 pmol des Erststrang-Primers (Oligo dT oder Random Primer) mit etwa 10 µg Gesamt RNA in RT-Puffer (Life Technologies) 5 min auf 65 °C erhitzt. Anschließend wurden 0,1 µM DTT, 1 mM dNTPs, 0,5 µl RNasin (Promega) und für den + RT Ansatz 50 units Superscript II (Life Technologies) bzw. für den – RT Ansatz keine Superscript II zugegeben und der Ansatz bei 39 °C 30 min, bei 42 °C und bei 47 °C je 10 min lang inkubiert. Das Enzym wurde 10 min bei 90 °C inaktiviert. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde in programmierbaren Heizblöcken der Firma Perkin Elmer (Cetus, GeneAmp 2000) durchgeführt. Ein 50 - 100 µl großer Reaktionsansatz enthielt PCR-Puffer, je 5 - 50 pmol der spezifischen Primer,

0,2 mM dNTPs, ca. 1 ng DNA und 0,3 - 5 units Taq-Polymerase. Ein Reaktionszyklus begann nach einer einmaligen Denaturierung für 2 min bei 94 °C mit 30 s bei 94 °C, anschließend 30 s bei 54 – 60 °C („annealing“) und 30 s bis 3 min bei 72 °C. Es wurden 30 bis 33 Zyklen durchlaufen. Abschließend erfolgte eine Inkubation für 4 - 5 min bei 72 °C. Der PCR-Puffer entsprach in der Zusammensetzung den Angaben des Herstellers der jeweiligen Taq-Polymerase (GibcoBRL).

2.7 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte photometrisch mit dem Bradford-Protein-Assay-System (Bio-Rad, München) nach Herstellerangaben.

2.8. Immunochemische Methoden

2.8.1 Generierung von polyklonalen Antikörpern

Die Generierung polyklonaler Antiseren erfolgte durch Immunisierung von Kaninchen mit bakteriell oder Baculovirus exprimierten Proteinen von der Firma BioScience (Göttingen).

2.8.2 Affinitätsreinigung von polyklonalen Antikörpern

Für die Affinitätsreinigung eines Antiserums wurden die spezifischen Antikörper an das an der DVS-Agarose immobilisierte Antigen adsorbiert und nach Entfernung der ungebundenen, unspezifischen Bestandteile eluiert. Kreuzreaktionen des Antiserums wurden durch Inkubation mit dem immobilisierten, kreuzreagierenden Protein entfernt. Die Koppelung der Antigene an die Agarose Matrix und die Durchführung der Affinitätsreinigung der Antikörper erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers der DVS-Agarose (MoBiTec).

2.8.3 Westernblot

Der immunologische Nachweis von bei der SDS-Page aufgetrennten Proteinen erfolgte durch Westernblot-Analysen. Hierzu wurden denaturierende SDS Proteingele (siehe 2.5.5) mit einer Trans-Blot semidry Transferkammer (Biorad) mit 2 mA/cm² für ein bis zwei Stunden auf eine Nitrocellulosemembran elektrotransferiert. Anschließend wurden die unspezifischen Bindungsstellen der Membran nach kurzem Waschen in PBS mit 0,5 % Blockingreagenz (Roche, Mannheim) für eine Stunde bei Raumtemperatur abgesättigt, bevor eine Inkubation bei 4 °C mit dem spezifischen Antikörper in geeigneter Verdünnung (1:4 bis 1:5000) in 0,5 % Blockingreagenz über Nacht erfolgte. Nachdem die Membran 3 mal kurz mit PBS gewaschen worden war, wurde das geeignete Sekundärantikörper-Peroxidase-Konjugat („goat-anti rabbit IgG“ oder „rabbit-anti mouse IgG“ beide Dianova) in einer 1:20.000 Verdünnung in 0,5 % Blockingreagenz in PBS zugegeben und unter Schütteln 4 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach intensivem drei- bis viermaligen Waschen mit PBS erfolgte die Detektion mit dem Chemiluminisenzsubstrat SuperSignal Ultra nach Angaben des Herstellers (Pierce).

2.8.4 Immunfluoreszenzanalyse von Zellkulturzellen

Für die Immunfluoreszenzanalyse wurden in Zelllinien entweder endogene oder transient exprimierte Proteine mittels affinitätsgereinigten polyklonalen oder mittels monoklonalen Antikörpern markiert und mit Hilfe eines an den entsprechenden Sekundärantikörper gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffes (Cy3, FITC oder Alexa488) nachgewiesen.

Deckgläser für die Mikroskopie wurden für 1 h in 20 % EtOH / 5 % Essigsäure geätzt, anschließend unter der Sterilarbeitsbank luftgetrocknet und durch UV-Licht sterilisiert. Auf die geätzten und anschließend mit poly-L Lysin beschichteten Deckgläser wurden etwa $0,5$ bis 2×10^5 Zellen (HEK293, HeLa3B2, HepG2, EMFI, 208F/WT oder FTO2B) in 1,5 cm Zellkulturschalen ausgesät und zum Anheften über Nacht im entsprechenden Medium inkubiert. Die Zellen wurden mit 500 μ l eines auf Trockeneis gekühlten Methanol / Aceton-Gemisches (1:1) für 5 min fixiert. Gewässert wurden die Zellen in 500 μ l PBS für 10 min bei Raumtemperatur. Nach der Absättigung der unspezifischen Bindestellen durch eine Inkubation mit 500 μ l PBS + 0,5 % BSA wurden die Erstantikörper in einer entsprechenden Verdünnung in 50 μ l PBS + 0,5 % BSA + 10 % Ziegeenserum auf die Deckgläser gegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zwei Waschschritten mit je 500 μ l PBS wurden die Deckgläser mit den in 50 μ l PBS + 0,5 % BSA 1:200 verdünnten entsprechenden Fluoreszenz-markierten Zweitantikörpern (FITC, Alexa488 oder Cy3) benetzt und eine weitere Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschschriff mit 500 μ l PBS wurde die DNA 10 min mit 1 μ g/ml Hoechst 33342 in 500 μ l PBS Fluoreszenz markiert. Es folgte ein weiterer Waschschriff mit 500 μ l PBS, bevor die Präparate mit Vectashield Mounting Medium (Vector-Laboratories) konserviert wurden. Die Lokalisation erfolgte mit Hilfe eines konfokalen Laserscanmikroskops (LSM 510) der Firma Zeiss und der LSM-Software LSM510.

2.8.5 Immunfluoreszenzanalyse von Quetschpräparaten

Für die Immunfluoreszenzanalyse von endogenen Proteinen aus Organen ohne den Erhalt der Gewebestruktur wurden Quetschpräparate erstellt und die zu untersuchenden Proteine mit affinitätsgereinigten polyklonalen oder mittels monoklonalen Antikörpern markiert und mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoff (Cy3, FITC oder Alexa488) gekoppelten Sekundärantikörpers nachgewiesen.

Die zu untersuchenden Organe wurden entnommen, durch Waschen mit PBS von anheftendem Blut befreit und anschließend mit Hilfe von Skalpell in ca. 1-5 mm³ Stücke zerkleinert. Je nach Beschaffenheit des Ausgangsmaterials wurden die zerkleinerten Gewebestücke entweder direkt weiterverwendet (Hoden, Leber) oder durch 1 stündige Inkubation mit 1 mg/ml Dispase und Kaspase in PBS bei 37 °C weiter dissoziiert (Lunge). Die Gewebestücke wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit PBS überschichtet. Geeignete Gewebeverdünnungen wurden anschließend durch eine Zentrifugation in der Cytospinzentrifuge der Firma Shandon Southern nach Herstellerangaben auf Deckgläschen transferiert. Nach dem Trocknen der Gewebe über Nacht erfolgte die Fixierung der Zellen mit einer 1:1 Mischung von in Trockeneis gekühlten Methanol / Aceton. Die weitere Vorgehensweise gleicht der unter 2.8.4 beschriebenen Methode.

2.8.6 Immunfluoreszenzanalyse von Gewebeschnitten

Für die Immunfluoreszenzanalyse von endogenen Proteinen aus Organen unter Erhalt der Gewebestruktur wurden Gefrierschnitte erstellt und die zu untersuchenden Proteine mit affinitätsgereinigten polyklonalen oder mittels monoklonalen Antikörpern markiert und mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes (Cy3, FITC oder Alexa488) gekoppelten Sekundärantikörpers nachgewiesen.

Zur Erstellung von Gefrierschnitten wurden ca. 5 mm³ große Gewebestücke aus den entsprechenden Organen entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Erstellung der Gewebeschnitte erfolgte in einem Kryo-Stat 2800 Frigocut der Firma Reichert-Jung nach Herstellerangaben. Nach der Fixierung der Zellen mit einer 1:1 Mischung von in Trockeneis gekühlten Methanol / Aceton erfolgte die weitere Färbung nach der unter 2.8.4 beschriebenen Methode.

2.9 Erstellung und Fraktionierung von Kernextrakten

Die Fraktionierung von Rattenleber-Kernextrakten erfolgte mit einer FPLC Anlage (Liquid Chromatography Controller 500, Pharmacia).

2.9.1 Präparation von Rattenleber-Kernextrakt

Die Präparation von Kernextrakt aus Rattenleber basiert auf der Methode von Gorski et al. (1986) mit einer von Döbbling et al. (1988) beschriebenen Modifikation.

Es wurden jeweils drei Ratten beiderlei Geschlechtes durch CO₂ Begasung getötet und sofort seziiert. Die entnommene Leber wurde zweifach mit eiskaltem PBS von anhaftendem Blut gereinigt und anschließend mit Hilfe von Skalpell in ca. 1 mm³ Stücke zerkleinert. Die zerkleinerte Leber wurde in 30 ml Homogenisationspuffer aufgenommen und mit einem in Eiswasser gekühlten 30 ml Glas-Teflon Homogenisator (Braun, Melsung) bei 900 rpm homogenisiert. Das Homogenisat wurde mit Homogenisationspuffer auf 150 ml verdünnt, in SW28 Zentrifugenröhrchen überführt und mit ca. 10 ml Homogenisationsmedium unterschichtet. Die Abtrennung der Zellkerne vom Cytoplasma erfolgte durch eine einstündige Ultrazentrifugation im SW28-Rotor bei 24.000 rpm und 2 °C. Das Kernsediment wurde mit Hilfe eines Glasstabes in 30 ml eiskaltem Kernpuffer resuspendiert, durch 10 Stöße mit einem Glasdouncer (Pistil-S) homogenisiert und mit Kernpuffer auf 105 ml verdünnt. Die Kerne wurden durch tropfenweise Zugabe von 1/10 Volumen 4 M (NH₄)₂SO₄ pH 7,9 auf einem Magnetrührer (120rpm) bei 4 °C 30 min extrahiert. Das ausgefallene Chromatin wurde durch Ultrazentrifugation (Ti45 Rotor, 35.000 rpm, 1 h, 2 °C) pelletiert. Proteine im Überstand wurden durch die schrittweise Zugabe von fein pulverisiertem (NH₄)₂SO₄ (0,3 g/ml) bei 4 °C während eines Zeitraums von 15 min unter Rühren auf dem Magnetrührer (150 rpm) präzipitiert und anschließend mindestens 30 min inkubiert. Das Präzipitat wurde im Ti45-Rotor bei 35.000 rpm für 25 min bei 2 °C sedimentiert, in 4,5 ml Puffer D/100 aufgenommen und 4x 1 h gegen je 250 ml Puffer D/100 dialysiert. Ausgefällene Proteine wurden bei 8000 rpm in der Kühlzentrifuge bei 2 °C sedimentiert. Der Überstand wurde aliquotiert, auf Trockeneis eingefroren und bei -80 °C gelagert. Alle verwendeten Puffer enthielten Proteaseinhibitoren.

Homogenisationspuffer:

- 10 mM Hepes pH 7,6
- 25 mM KCl
- 0,15 mM Spermin
- 0,5 mM Spermidin
- 1 mM EDTA
- 2 M Sucrose
- 10 % Glycerin

Kernpuffer:

- 10 mM Hepes pH 7,6
- 40 mM KCl
- 0,1 mM EDTA
- 1 mM DTT
- 10 % Glycerin

Puffer D/100:

- 25 mM Hepes pH 7,9
- 0,2 mM EDTA
- 2 mM DTT
- 10% Glycerin
- 100 mM KCl

2.9.2 Phosphocellulose P11-Chromatographie

Kernextrakte wurden auf Eis aufgetaut und auf eine aktivierte und äquilibrierte Phosphocellulose-säule mit einer Flußrate von 15 ml/cm²/h aufgetragen. Nicht bindende Proteine (Durchlauf) wurden gesammelt. Die Säule wurde anschließend mit 2 Säulenvolumen Puffer D/100 gewaschen und die gebundenen Proteine in drei Salzstufen (300 mM, 475 mM, 850 mM KCl) eluiert. Die proteinhaltigen Fraktionen der einzelnen Salzstufen wurden vereinigt, 4x 1 h gegen je 250 ml Puffer D/100 dialysiert und die Proteinkonzentration der einzelnen Fraktionen bestimmt. Die Fraktionen wurden aliquotiert, auf Trockeneis eingefroren und bei -80 °C gelagert.

2.9.3 DEAE-Sepharose Chromatographie

Die P11 Fraktionen A, C und D wurden auf einer DEAE-Sepharose CL-6B Säule (Pharmacia) weiter aufgetrennt. Die Säule wurde bei einer Flußrate von 21 ml/cm²/h gepackt und mit ca. 2,5 mg Protein/ml Säulenmaterial bei einer Flußrate von 15 ml/cm²/h beladen. Die Elution erfolgte in unterschiedlichen Salzstufen bei einer Flußrate von 15 ml/cm²/h. Die Fraktion A wurde bei 100 mM (Fraktion AA), 300 mM (AB), 500 mM (AC) und 850 mM KCl (AD), die Fraktion C bei 100 mM (CA), 250 mM (CB), 1 M KCl (CC) und die Fraktion D bei 180 mM (DA), 320 mM (DB), 600 mM (DC) bzw. ohne die Salzstufe bei 320 mM direkt bei 600 mM (D(BC)) eluiert.

2.9.4 MonoQ-Chromatographie

Die weitere Auftrennung der Fraktion CC erfolgte durch Mono Q HR5/5 (Pharmacia) Chromatographie. Hierzu wurde die äquilibrierte Säule mit 1-3 mg Protein in Puffer D/100 bei einer Flußrate von 0,4 ml/min beladen, mit 3 ml Ladepuffer gewaschen und bei derselben Flußrate mit einem linear- ansteigenden Salzgradienten (Puffer D mit 100 bis 700 mM KCl) in 9,6 ml eluiert. Die Proteinkonzentration der Fraktionen (je 0,8 ml) wurde bestimmt und anschließend die Fraktionen auf Trockeneis eingefroren und bei -80 °C gelagert.

2.9.5 Phenylsepharose FastFlow (high sub) – Chromatographie

1,6 mg COPRA enthaltende MonoQ Fraktionen wurden vereinigt und 3x 1 h gegen je 300 ml 1,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,0, 1 mM DTT dialysiert. Ausgefallene Proteine wurden bei 8000 rpm in der Kühlzentrifuge bei 2 °C sedimentiert. Die äquilibrierte Säule wurde bei einer Flußrate von 1 ml/min beladen. Die Elution erfolgte durch einen linear absteigenden Salzgradienten (1,5 M bis 50 mM Natriumphosphatpuffer). Die Proteinkonzentration der eluierten Fraktionen (je 0,5 ml) und der nicht löslichen Proteine wurde bestimmt, anschließend die Fraktionen auf Trockeneis eingefroren und bei -80 °C gelagert.

2.9.6 Affinitätsanreicherung von PR interagierenden Proteinen

Zu 150 µg im Baculovirussystem rekombinant erstelltem humanem PR wurden 50 µl der gewaschenen Ni-NTA-Agarose-Suspension zugegeben und 1 h auf dem Rollinkubator bei 4 °C inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Agarose dreimal mit je 50 µl Puffer D/100 gewaschen. Nach dem Entfernen des Überstandes wurden 100 µl Rattenleber-Kernextrakt zu dem an Ni-NTA Beads gebundenen PR gegeben und erneut 1 h bei 4 °C auf dem Rollinkubator inkubiert. Nach einer Zentrifugation in der Kühlzentrifuge (1200 rpm, 4 °C, 2 min) wurde der Kernextraktberstand abgenommen, nochmals zentrifugiert und in der in-vitro Transkription eingesetzt. Der Ni-NTA Niederschlag wurde mit Bindepuffer + 5 mM Imidazol gewaschen. Die Elution des PR erfolgte durch die Zugabe von 50 µl Bindepuffer + 100 mM Imidazol. Nach dem die Ni-NTA Agarosebeads in der Kühlzentrifuge depletiert worden waren, wurde die PR-Lösung abgenommen und 2 mal gegen je 100 ml Puffer D/100 dialysiert. Anschließend wurde der PR in der in-vitro Transkription eingesetzt.

2.9.7 Affinitätsanreicherung mit GST-Fusionsproteinen

Zu 60 µl quibrierter Glutathion-Sepharose 4B Lösung wurde 100 µg des entsprechenden GST Fusionsproteins und weitere 250 µl NET Puffer, dem Proteaseinhibitoren (PMSF, Benzamidin, Leupeptin, Pepstatin A) und 2 mM DTT zugesetzt worden waren, gegeben. Nach einer einstündigen Inkubation auf dem Rollinkubator bei 4 °C wurde der Überstand entfernt, die Beads mit Puffer D/100 gewaschen und zu den Beads 500 µl Rattenleber-Kernextrakt gegeben. Nach einer zweistündigen Inkubation bei 4 °C auf dem Rollinkubator wurde der Überstand vom Niederschlag durch Zentrifugation (1600 rpm, 2 min) getrennt. Der Überstand wurde mit Glycerin versetzt und auf Trockeneis weggefroren. Die Beads wurden durch Zugabe von 200 µl 0,3 M KCl HEGN bzw. 0,5 M KCl HEGN jeweils zweifach gewaschen. Die Elution der gebundenen Komplexe erfolgte durch die Zugabe von 0,1 M HEGN dem 0,1 % Deoxycholat zugesetzt worden waren. Die HEGN Puffer enthielten jeweils 1 mM DTT, und 10 µg/ml PMSF und je 2 µg/ml Pepstatin A, Benzamidin und Leupeptin.

NET-Puffer: 20 mM Tris/HCl pH 8
100 mM NaCl
1 mM EDTA

HEGN-Puffer: 20 mM Hepes pH 7,9
0,1 mM EDTA
10 % Glycerin
0,1 % NP40

2.10 In-vitro Assembly und Analyse von Chromatin

2.10.1 Präparation von *Xenopus* Oocyten-Assemblyextrakt

Nachdem ein weiblicher *Xenopus* betäubt wurde, wurde dem Frosch das Ovar entnommen. Anhaftendes Blut wurde durch dreimaliges Waschen mit je 150 ml frischem Puffer OR2 entfernt. Das Ovar wurde mit 100 ml Puffer OR2 in eine 250 ml Flasche überführt. Nach der Zugabe von 0,15 g Collagenase wurden das Ovar 3 h in einem Wasserbad bei 25 °C und 60 rpm inkubiert. Die vereinzelt Oocyten wurden anschließend 5x mit 200 ml frischem OR2 Puffer gewaschen und durch Dekantieren die großen Stadium 6 Oocyten von den unreiferen, kleineren Oocyten abgetrennt. Nach dreimaligem Waschen mit je 50 ml kaltem Extraktionspuffer wurde die Oocytenlösung in SW41 Ultrazentrifugationsröhrchen überführt und im SW41-Rotor (36.000 rpm, 2 h, 4 °C) zentrifugiert. Mit einer 19 gauge Nadel wurden die löslichen Bestandteile der Oocyten abgesaugt, die Lösung aliquotiert und auf Trockeneis eingefroren.

Puffer OR2:

2,5 mM KCl
82,5 mM NaCl
5 mM Hepes pH 7,5
1 mM Na₂HPO₄ pH 7,6
1 mM CaCl₂
1 mM MgCl₂

Extraktionspuffer:

1 mM EGTA
5 mM KCl
1,5 mM MgCl₂
10 % Glycerin
20 mM Hepes pH 7,5
10 mM β-Glycerinphosphat
0,5 mM DTT
10 µg/ml PMSF
2 µg/ml Pepstatin A
2 µg/ml Benzamidin
2 µg/ml Leupeptin

2.10.2 Chromatinassembly Reaktion

Zu 135 ng supercoiled-Plasmid DNA in 1 µl H₂O wurden 39 µl Oocytenextrakt gegeben. Nach Zugabe von 5 µl 1 ng/µl Kreatinkinase und von 5 µl ATP-Mix erfolgte eine 3 h Inkubation bei 37 °C. Das assemblierte Chromatin wurde in Micrococcal-Nuklease-Verdaustudien oder in zellfreien Transkriptionen analysiert.

<i>ATP-Mix:</i>	1 mM MgCl ₂
	1 mM EGTA
	5 mM KCl
	600 mM Kreatin-Phosphat
	10 mM β-Glycerin-Phosphat
	0,5 mM DTT
	25 mM ATP
	10 % Glycerin
	20 mM Hepes pH 7,0
	10 µg/ml PMSF
	2 µg/ml Pepstatin A
	2 µg/ml Benzamidin
	2 µg/ml Leupeptin

2.10.3 Micrococcal-Nuklease-Verdau Reaktion

Zu 50 µl der Chromatinassemblyreaktion wurde 2 µl 0,1 M CaCl₂ und 0,5 µl Micrococcal-Nuklease (MNase) gegeben. Die Nukleasereaktion von jeweils ¼ des Ansatzes wurde nach 1 min, 2 min, 4 min und 10 min durch die Zugabe von je 4 µl Stop-Puffer beendet und die Proteine nach der Zugabe von 80 µl Proteinase K Verdauopuffer 2 h lang bei 37 °C verdaut. Nach einer Ethanolfällung wurden die DNA-Fragmente auf einem 1,5 % Agarosegel aufgetrennt, geblottet, mit einer radioaktiv markierten Sonde hybridisiert und durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

<i>Stop-Puffer:</i>	100 mM EDTA
	2,5 % SDS

<i>Proteinase K Verdauopuffer:</i>	25 mM Tris pH 7,5
	10 mM EDTA
	0,5 % SDS
	400 µg/ml Proteinase K

2.11 Zellfreie Transkriptionsreaktion

Die zellfreie Transkription (in-vitro Transkription) unter Verwendung von Rattenleber-Kernextrakt wurde nach Pfitzner et al., 1993 durchgeführt. Die RNA wurde wie von Klein-Hitpass et al., 1990 beschrieben aufgearbeitet. Die Rekonstitution der Transkription erfolgte durch Mischen von rekombinanten bzw. partiell aufgereinigten Proteinen nach Klotzbücher et al., 1997.

Für in-vitro Transkriptionen auf Chromatintemplates wurden an Stelle der „nackten“ Reporterkonstrukte durch *Xenopus* Oocytenextrakt in Chromatin verpackte Reporterkonstrukte eingesetzt. Hierzu wurden 24 µl des Assembly Ansatzes, der ca. 60 ng Reporter-Plasmid enthielt, in der von Klotzbücher et al., 1997 beschriebenen zellfreien Transkription eingesetzt. Da die ATP Konzentration in den Assemblyansätzen hoch genug war, wurde jedoch kein zusätzliches ATP zu den Transkriptionsreaktionen gegeben. Die Salzbedingungen wurden durch die Verwendung von Puffer D/100 auf 60 mM KCl eingestellt. Die Transkription erfolgte so in einem Volumen von 40-50 µl (innerhalb einer Versuchsreihe immer einheitlich) für 45 min bei 30 °C und wurde durch Zugabe von 60 µl Chromatin-TK-Stop beendet. Nach weiteren 30 min bei 30 °C wurde 100 µl Urea-Stop zugegeben. Durch die Zugabe von 100 µl 7,5 M NH₄-Acetat pH 8,0 und 850 µl Ethanol wurden die Nukleinsäuren für 20 min auf Trockeneis oder über Nacht bei -20 °C gefällt.

Die weitere Aufarbeitung und die Auftrennung auf einem Polyacrylamidgel erfolgte analog der von Klotzbücher et al., 1997 beschriebenen Prozedur.

<i>Chromatin-TK-Stop:</i>	25 mM Tris/HCl (pH 7,5)
	10 mM EDTA
	0,5 % SDS
	300 µg/ml Hefe-tRNA
	600 µg/ml Proteinase K

<i>Urea-Stop:</i>	7 M Harnstoff
	10 mM Tris/HCl (pH 6,8)
	10 mM EDTA

3 Ergebnisse

3.1 Die in-vitro Transkription unter Zugabe von Rattenleber-Kernextrakt

Die Transkription erfolgt in der Zelle im Zellkern. Für die basale Transkription benötigt die Zelle basale Transkriptionsfaktoren wie z.B. die RNA-Polymerasen. Um für in-vitro Transkriptionsreaktionen die Verhältnisse im Zellkern nachzubilden, gibt man zu einem Reporterkonstrukt einen Zellkernextrakt, der alle für die Transkription benötigten Proteine enthält, und Nukleotide hinzu.

Eine Aktivierung der Transkription erfolgt in der Zelle im allgemeinen auf der Ebene der Initiation, wobei Aktivatoren die Bildung von funktionellen Initiationskomplexen durch Stabilisierung des Komplexes und durch Auflockerung der Chromatinstruktur beschleunigen und somit die Rate der Transkriptions-Initiationsreaktionen erhöhen. Die Steroidhormonrezeptoren, zu denen auch der Progesteron-Rezeptor (PR) zählt, können nach Bindung des entsprechenden Steroidhormons dimerisieren, an spezifische Erkennungssequenzen von Zielgenen im Promotor binden und durch die Aktivierungsdomänen AF1 – AF3 (Abb. 1A) die Transkription aktivieren. Bei der in-vitro Transkription lassen sich diese Bedingungen durch die Zugabe von im Baculovirusexpressionssystem rekombinant hergestellten und durch Ni-NTA Affinitätschromatographie aufgereinigten PR nachvollziehen.

Die Analyse der Transkriptionsaktivierung durch den rekombinant hergestellten PR erfolgte im zellfreien Transkriptionssystem unter Zugabe von Rattenleber-Kernextrakt. Die Promotoren der Reporterkonstrukte enthielten entweder zwei spezifische Progesteron-Rezeptor-Erkennungssequenzen (PREs) vor der TATA-Box des Ovalbumin-Gens (PRE₂-TATA, Abb. 1b) oder als interne Kontrolle nur diese TATA-Box (TATA, Abb. 1B) (Klein-Hitpass et al., 1990). Die Transkripte dieser beiden Reporterkonstrukte konnten durch unterschiedliche Länge der verwendeten G-freien Kassetten (Sawadogo und Roeder, 1985) unterschieden werden. Bei der Verwendung einer G-freien Kassette wird bei der Transkriptionsreaktion kein GTP eingesetzt, sondern nur das GTP-Analogon 3'OmGTP, wobei der Einbau von 3'OmGTP zu einer Termination der Transkriptionsreaktion am ersten G-Nukleotid außerhalb der G-freien Kassette in der Vektorsequenz führt. Die so entstehenden Transkripte der Reporterkonstrukte besitzen somit eine genau definierte Größe und können dadurch unterschieden werden.

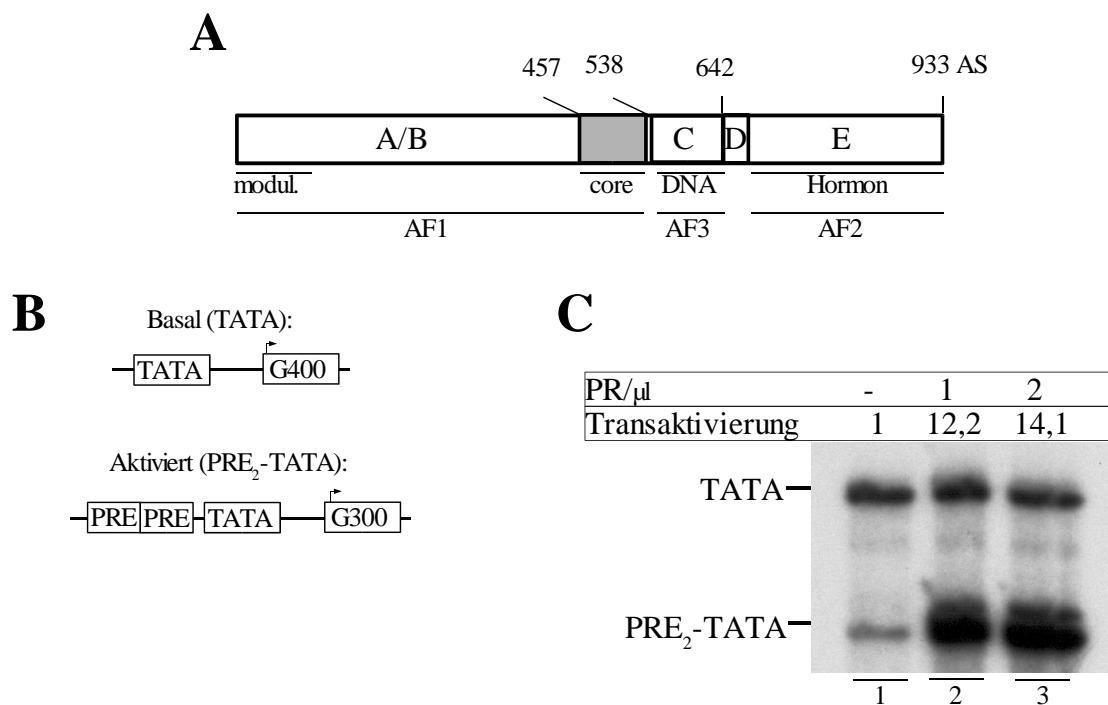


Abb. 1: Aktivierung der Transkription durch rekombinanten PR in einem zellfreien Transkriptionssystem:

- (A) Dargestellt ist die Domänenstruktur des humanen Progesteron-Rezeptors (PR) schematisch mit den Homologie-regionen A/B bis E nach Meyer et al. (1992). Zusätzlich sind die Aktivierungsfunktionen (AF) sowie die DNA- und die Hormon-Bindungsdomänen gezeigt. In der AF1 sind die Kern-Region („core“) und die modulierende Region (modul.) angegeben.
- (B) Schematische Darstellung der in der zellfreien Transkription eingesetzten Reporterkonstrukte. Der basale TATA-Promotor besteht aus der TATA-Box des Ovalbumin-Promotors (TATA) vor einer 400 nt langen G-freien Kassette (G400). Das durch den PR aktivierbare Reporterkonstrukt (PRE₂-TATA) besteht aus 2 PREs aus dem Tyrosin-Aminotransferase Promotor und der TATA Box des Ovalbumin-Promotors vor einer 300 nt langen G-freien Kassette (G300).
- (C) Zellfreie Transkription mit 4 μ l Rattenleber-Kernextrakt sowie steigender Mengen an PR. Die Transkripte der basalen und der aktivierten Reporter sind markiert. Die Transaktivierungen, berechnet als Verhältnis der PRE₂-TATA Transkripte zu den TATA Transkripten, normalisiert auf die Kontrolle ohne rekombinante Aktivatoren, (Spur 1) sind angegeben.

Ohne die Zugabe des Progesteron-Rezeptors kann zum Vergleich die basale Aktivität der Promotoren der Reporterkonstrukte in der in-vitro Transkription analysiert werden (Abb. 1C, Spur 1). Die beiden eingesetzten Reporterkonstrukte (TATA – obere Bande, PRE₂-TATA – untere Bande, Abb. 1C) zeigen erwartungsgemäß unterschiedliche Transkriptgrößen. Die Zugabe des rekombinant erstellten PR stimuliert PRE-Template abhängig (Abb. 1C, Spuren 2-3), da die Transkriptionsrate der internen Kontrolle (TATA) im Gegensatz zu der Transkriptionsrate auf dem PRE-haltigen Reporterkonstrukt (Abb. 1C, Spuren 2-3) durch Zugabe des PR kaum beeinflusst wird. Zur Quantifizierung der Aktivierung wurden die Bandenintensitäten mit dem BioImager BAS1500 (Fuji) detektiert und mit Hilfe der Software Aida 2.0 ausgewertet. Der Quotient der aktivierten Transkription zur internen Kontrolle wurde berechnet, wobei zur Normalisierung das Ergebnis des Quotienten bei Abwesenheit des rekombinanten PR auf 1,0 gesetzt wurde. Der Faktor der

Transaktivierung durch die Zugabe des PR auf dem PRE₂-TATA Promotor lag in diesem Experiment bei 14,1, wobei die Zugabe von 1 µl PR zu der in-vitro Transkriptionsreaktion schon sättigend war, da die Zugabe von 2 µl PR nur zu einer geringfügig stärkeren Aktivierung führte.

Wie von Klotzbücher et al., 1997 gezeigt werden konnte, aktiviert der rekombinant erstellte PR in-vitro die Transkription ohne die Zugabe von Hormon.

3.2 Die Suche nach Kofaktoren des PR in einem rekonstituierten in-vitro Transkriptionssystem

Zur Kofaktorsuche benutzte Dr. Klotzbücher in seiner Dissertation den Ansatz des rekonstituierten in-vitro Transkriptions-Systems. Wie an der Aktivierung der Transkription in Rattenleber-Kernextrakt erkennbar ist, liegen alle für die basale und für die durch den PR aktivierte Transkription benötigten Faktoren, wie z.B. RNAPII, die generellen Transkriptionsfaktoren oder auch Kofaktoren, in dem Kernextrakt vor. Dr. Klotzbücher reinigte nun den Kernextrakt durch säulenchromatographische Schritte auf und ersetzte bei der in-vitro Transkriptionsreaktion den vollständigen Kernextrakt durch aufgereinigte Fraktionen bzw. durch rekombinante Faktoren. Es gelang ihm so ein Transkriptionssystem aufzubauen, welches alle für die basale Transkription notwendigen Faktoren enthielt, gleichzeitig aber an für Rezeptor-vermittelte Transaktivierung notwendigen Kofaktoren depletiert war. Durch die Zugabe von Kofaktor enthaltenden Fraktionen konnte er die Transaktivierungsfähigkeit in diesem rekonstituierten System wieder herstellen und so die Kofaktor enthaltenden Fraktionen identifizieren. Den von ihm postulierten Kofaktor nannte er COPRA (cofactor of progesterone receptor activation). Um COPRA weiter aufzureinigen und weiter zu charakterisieren wurde dieses Aufreinigungsschema von mir nachvollzogen. Dazu wurde Rattenleber-Kernextrakt zuerst auf einer Phosphocellulose P11-Chromatographiesäule durch eine Salzstufenelution in 4 Fraktionen aufgetrennt (Abb. 2A). Die P11 Fraktionen A, C und D wurden weiter durch eine DEAE-Sepharose-Chromatographie durch Salzstufenelution aufgetrennt (Abb. 2A). Dr. Klotzbücher konnte durch immunologische Westernblotanalysen sowie durch funktionelle Studien die in Abb. 2A angegebenen Faktoren in den einzelnen Fraktionen nachweisen. Die Identifizierung der Kofaktor-enthaltenden Fraktion gelang ihm im rekonstituierten System durch das Ersetzen der Fraktion CC durch rekombinant erstelltes TFIIE und TFIIIF und durch eine noch weiter über eine MonoQ Sepharose Chromatographie aufgetrennte RNAPII Fraktion (Abb. 2A).

Das von mir nachvollzogene rekonstituierte Transkriptionssystem, bei dem der Kernextrakt durch die DEAE-Fraktionen AB und DA, durch eine hochangereicherte MonoQ RNA-Polymerase II

Fraktion (Abb. 2A) und durch die rekombinant erstellten Transkriptionsfaktoren TFIIE und TFIIF ersetzt wurde, zeigte ebenso wie bei Dr. Klotzbücher keine oder eine nur schwache Aktivierung durch Zugabe des PR (Abb. 2B, vergleiche Spur 1 mit Spur 2). Erst die Zugabe einer durch einen linearen Salzgradienten auf einer MonoQ Sepharose Chromatographiesäule weiter aufgereinigten COPRA enthaltenden Fraktion regeneriert das PR Transaktivierungspotential auf dem PRE₂-TATA Promotor (Spuren 3-7). Außerdem koeluiert COPRA, wie Dr. Klotzbücher 1997 zeigen konnte, mit einem Inhibitor der basalen Transkription (Abb. 2B, Spuren 3-7 und Spur 8). Selbst die Zugabe von sehr geringen Konzentrationen der COPRA Fraktion inhibiert die basale Kontrolltranskription vollständig (TATA-Bande, Spuren 3-7 und Spur 8). Nur die stark aktivierte Transkription nach Zugabe von PR und COPRA ist weiterhin auf der Autoradiographie sichtbar (Spuren 3-7). Somit konnte auf Grund des Fehlens der basalen Kontrolltranskription der genaue Faktor der PR vermittelten Transaktivierung durch COPRA Zugabe nicht bestimmt werden (Spuren 3-7).

Der Effekt von COPRA ist deutlich abhängig von der Anwesenheit des PR und von PREs in dem Promotor. Eine Stimulierung durch einen in der COPRA Fraktion enthaltenden PRE bindenden Faktor kann somit ausgeschlossen werden (Spur 8).

Zusätzlich zu der von Dr. Klotzbücher gefundenen COPRA enthaltenden MonoQ Fraktion, konnte eine weitere Fraktion mit COPRA vergleichbaren Eigenschaften identifiziert werden (Abb. 2C und D). Möglicherweise eluiert COPRA bei der P11 Phosphocellulose Chromatographie nicht ausschließlich in der 475 mM KCl Fraktion C, sondern zum Teil auch in der 850 mM KCl Fraktion D. Im Gegensatz zu der vorher beschriebenen chromatographischen Aufreinigung der Fraktion CC erfolgte die weitere Aufreinigung der Fraktion D zur Suche des Koaktivators in 2 Salzstufen auf der DEAE Sepharose Chromatographiesäule. Die Elution der ersten Stufe wurde bei 180 mM KCl (DA) und die Elution der zweiten Koaktivator enthaltenden Stufe bei 600 mM KCl (D(BC)) durchgeführt (Abb. 1C).

Es zeigt sich zum einen, daß diese Koaktivator enthaltende Fraktion die Transkription ohne Zugabe des PR nicht aktiviert (Abb. 2D, Spur 3) und zum anderen, daß der PR im rekonstituierten System, ähnlich wie in Abb. 1B gezeigt, ohne Zugabe einer Koaktivator enthaltenden Fraktion die Transkription nur schwach aktivieren kann (Abb. 2D, vergleiche Spuren 1 und 2). Erst nach der Zugabe des PR und der Fraktion D(BC) ist eine Transaktivierung um den Faktor 10,3 auszumachen (Abb. 2D, Spur 4). Im Gegensatz zu der MonoQ - COPRA Fraktion, koeluiert die Fraktion D(BC) nicht mit einem Inhibitor der basalen Transkription. Da die Koaktivator Eigenschaften der Fraktion D(BC) bei der in-vitro Transkription den Eigenschaften der COPRA haltigen MonoQ Fraktion gleichen, ist es wahrscheinlich, daß die Aktivität der beiden Fraktionen durch denselben Koaktivator bewirkt wird.

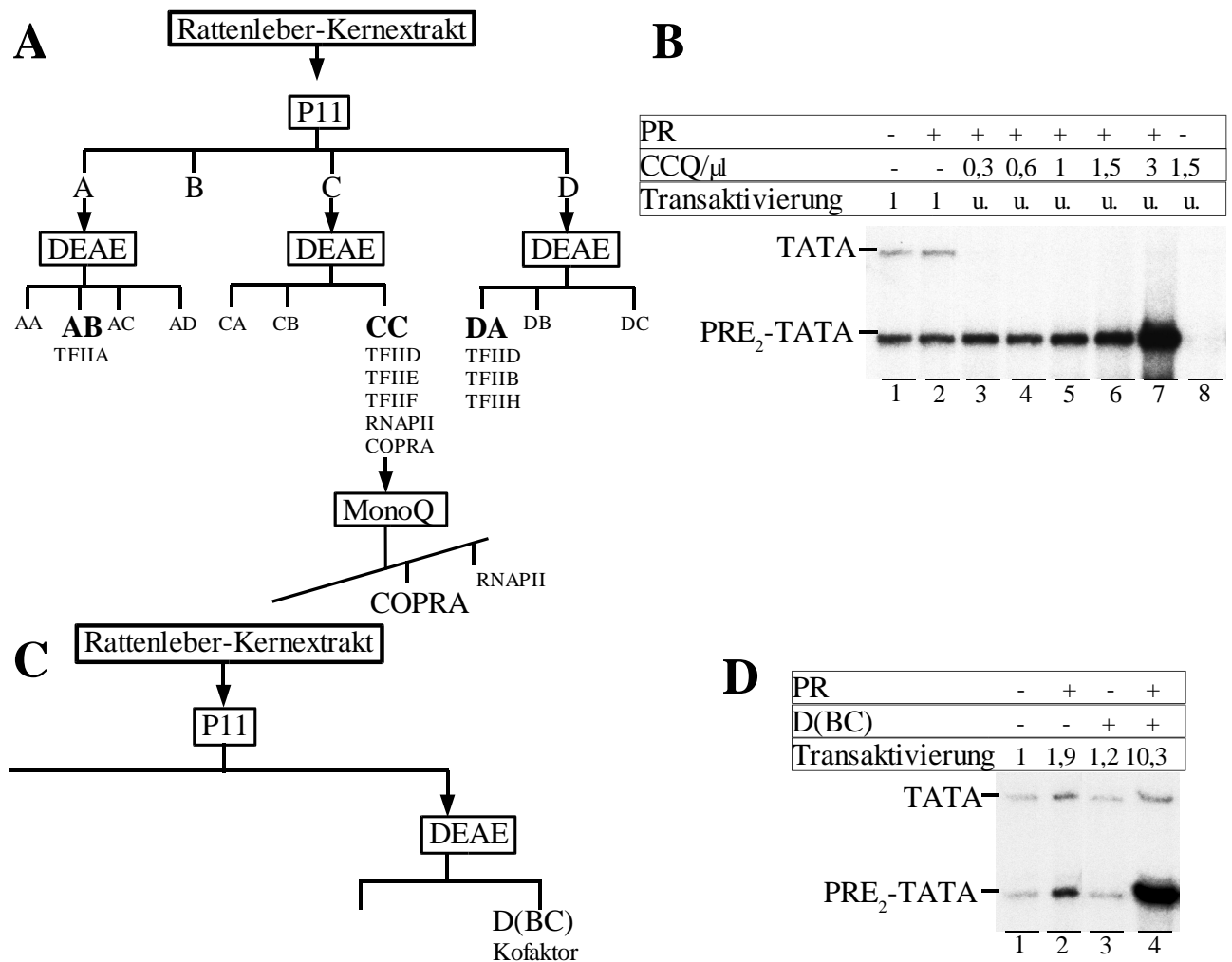


Abb. 2: Rekonstitution der zellfreien Transkription und COPRA Detektion

- (A) Aufreinigungsschema zur Erstellung eines hochaufgereinigten zellfreien Transkriptionssystems. Rattenleber-Kernextrakt wurde bei 100 mM KCl auf eine Phosphocellulose P11-Säule (P11) gegeben. Der Durchlauf der Säule ergab die Fraktion A, die gebundenen Proteine wurden mit 300 mM (B), 475 mM (C) und 850 mM (D) KCl von der Säule eluiert. Die Phosphocellulose P11 Fraktionen A und C wurden bei 100 mM und die P11-Fraktion D bei 180 mM KCl auf einer DEAE-Sephharose-Säule (DEAE) aufgetragen. Fraktionen AA, CA und DA entsprechen den Durchläufen der Säulen. Die gebundenen Proteine wurden mit 300 mM (AB), 500 mM (AC), 850 mM KCl (AD), 250 mM (CB), 850 mM KCl (CC), 320 mM (DB) und 600 mM KCl (DC) eluiert. Die Fraktion CC wurde über eine MonoQ-Säule weiter aufgetrennt. Groß und fett sind die für den Aufbau der rekonstituierten in-vitro Transkription notwendigen Fraktionen mit den durch immunologische und funktionelle Tests bestimmten Bestandteilen angegeben.
- (B) Rekonstitution der zellfreien Transkription mit 0,7 μ l DEAE-Fraktion AB, 2 μ l DEAE-Fraktion DA, 2,5 μ l RNAPII MonoQ-Fraktion und 60 ng TFIIE und 90 ng TFIIF. Die Spuren 3-8 enthalten die angegebenen Mengen der COPRA-haltigen MonoQ Säulenfraktion (CCQ). Die Reaktion wurde bei Anwesenheit (+) bzw. Abwesenheit (-) von PR durchgeführt. Die Transkripte der basalen und der aktivierten Reporter sind markiert. Die Transaktivierungen, berechnet als Verhältnis der PRE₂-TATA Transkripte zu den TATA Transkripten, normalisiert auf die Kontrolle ohne rekombinante Aktivatoren (Spur 1) konnten in den Spuren 3-8 auf Grund des Fehlens der basalen Transkription nicht berechnet werden (u. = unbestimmt).
- (C) Aufreinigungsschema eines Koaktivators aus der Phosphocellulose P11 Fraktion D. Die Fraktion wurde bei 180 mM KCl auf eine DEAE-Sephharose Säule aufgetragen. Die Fraktion DA entspricht dem Durchlauf der Säule. Die gebundenen Proteine wurden bei 600 mM KCl von der Säule eluiert (Fraktion D(BC)).
- (D) Rekonstitution der zellfreien Transkription wie unter (B). In den Spuren 3 und 4 wurden je 4 μ l der Koaktivator haltigen Fraktion D(BC) zugegeben. Die Reaktionen wurden bei Anwesenheit (+) bzw. Abwesenheit (-) des PR durchgeführt. Die PR vermittelte Transaktivierung (Quotient aktivierte/basale Transkription normalisiert auf die Kontrolle ohne PR) ist angegeben. Transkripte der basalen und der aktivierten Reporter sind markiert.

3.3 Weitere Aufreinigung der COPRA enthaltenden MonoQ-Fraktion

Zur weiteren Aufreinigung von COPRA sollten die Kofaktor-enthaltenden Fraktionen über säulenchromatographische Schritte weiter angereichert werden. Die COPRA enthaltenden MonoQ Säulenfraktionen wurden hierzu durch eine hydrophobe-Interaktionschromatographie weiter aufgetrennt. Bei einer solchen chromatographischen Säule binden die Proteine unter Hochsalzbedingungen (1,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) an die Säule und eluieren je nach Eigenschaft der Säule und der Proteine mit abfallender Salzkonzentration (Abb. 3A).

Die bei der Dialyse gegen 1,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ausgefallenen Proteine wurden abzentrifugiert (Fraktion CCQA), die unter diesen Salzbedingungen löslichen Proteine auf eine Phenylsepharose FF Säule aufgetragen und mit absteigendem Salzgradienten eluiert.

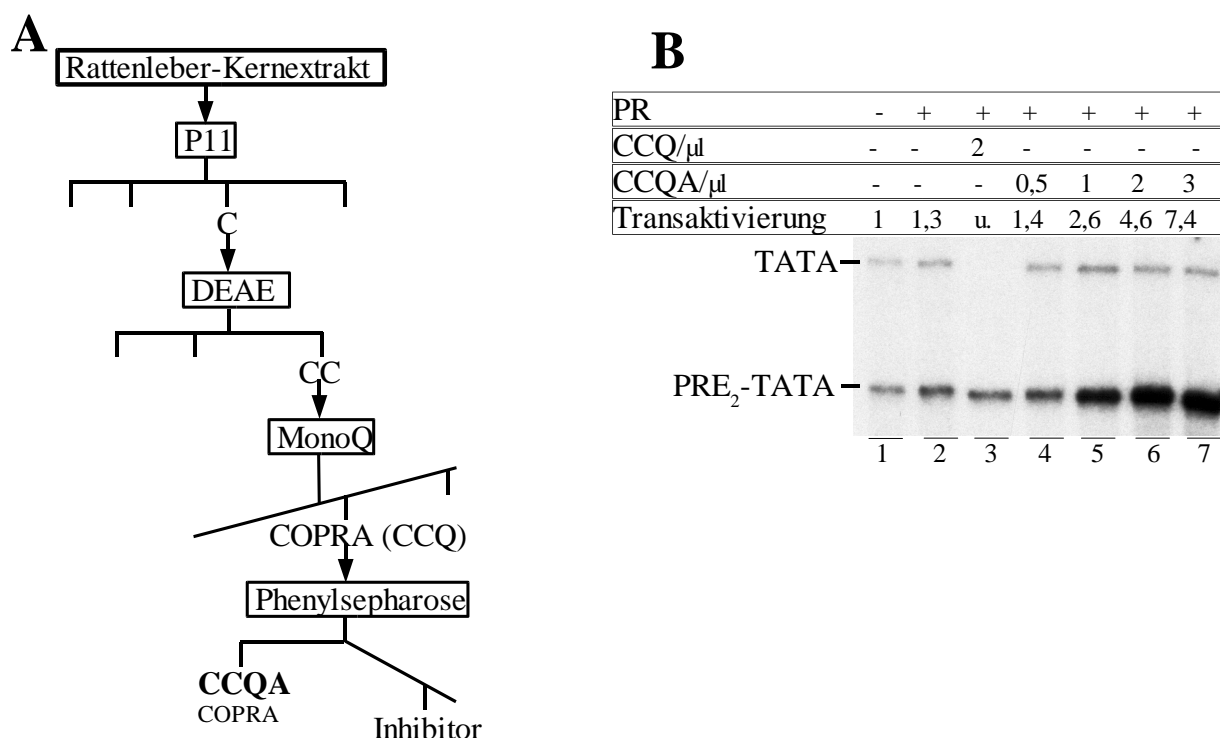


Abb. 3: Weitere Anreicherung von COPRA aus der Kofaktor haltigen MonoQ Fraktion

- (A)** Aufreinigungsschema der COPRA angereicherten Fraktion CCQA aus Rattenleber-Kernextrakt. Die MonoQ-COPRA Fraktion wurde gegen 1,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dialysiert, die ausgefallenen Proteine abzentrifugiert und die in Lösung verbleibenden Proteine auf einer Phenylsepharose FF mit absteigenden Salzgradienten eluiert. Die Fraktion der ausgefallenen Proteine wurde CCQA bezeichnet, der Inhibitor der Transkription eluiert von der Säule bei ca. 0,7 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.
- (B)** Rekonstituiertes zellfreies Transkriptionssystem mit 0,7 μl DEAE-Fraktion AB, 2 μl DEAE-Fraktion DA, 2,5 μl RNAPII MonoQ-Fraktion und 60 ng TFIIE und 90 ng TFIIF. Die Reaktionen wurden bei Anwesenheit (+) bzw. Abwesenheit (-) des PR durchgeführt. Spur 3 enthält zusätzlich 2 μl der COPRA haltigen MonoQ Fraktion CCQ. Die Spuren 4-7 enthalten die angegebenen Mengen der COPRA haltigen Fraktion CCQA. Die Transkripte der basalen und der aktivierten Reporter sind markiert. Die Transaktivierungen, berechnet als Verhältnis der PRE₂-TATA Transkripte zu den TATA Transkripten, normalisiert auf die Kontrolle ohne rekombinante Aktivatoren (Spur 1) sind in der Spur 3 auf Grund der zu schwachen Transkripte der basalen Kontrolle unbestimmt (u.) und in den Spuren 2 und 4-7 angegeben.

Bei der Überprüfung der Koaktivatoreigenschaften der Elutionsfraktionen im rekonstituierten System zeigte sich, daß eine schwache COPRA Aktivität in den Fraktionen 2-4, die etwa bei 1,4 M bis 1,3 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ von der Säule eluieren, nachweisbar war (nicht gezeigt). Die inhibitorischen Anteile eluieren von der Phenylsepharose FF bei ca. 700 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und sind somit von der COPRA Aktivität, getrennt (nicht gezeigt). Bei der Analyse der einzelnen Fraktionen stellte sich jedoch heraus, daß der Hauptanteil der COPRA Aktivität vor der säulenchromatographischen Auftrennung bei der Hochsalzdialyse ausgefallen war (Abb. 3B, Spuren 4-7). Die inhibitorische Aktivität, die auf der MonoQ Säule noch mit COPRA koeluiert, ist so von der COPRA Fraktion getrennt worden. Da der Effekt dieser weiter angereicherteren COPRA Fraktion ebenfalls wie die COPRA haltige MonoQ-Säulenfraktion nur PR vermittelt die Transkription auf einem PRE-Template aktiviert, handelt es sich bei dieser Fraktion nicht um eine konzentrierte Fraktion eines allgemeinen Transkriptionsaktivators, sondern tatsächlich um eine Kofaktor haltige Fraktion. Die relative Transaktivierung erreicht bei den getesteten COPRA Konzentrationen dieser Fraktion einen dosisabhängigen Faktor von maximal 7,4.

Eine Zuordnung der säulenchromatographisch angereicherten COPRA Aktivität zu einer Proteinbande auf einem silbergefärbten SDS-Polyacrylamidgel war auf Grund der vielen vorkommenden Proteinbanden nicht möglich (nicht gezeigt).

Eine weitere Aufreinigung über herkömmliche säulenchromatographische Schritte, wie z.B. über eine Gelfiltrations- oder eine Hydroxylapatite-Säule wurde versucht. Die Kofaktor-Aktivität konnte jedoch wahrscheinlich auf Grund der zu starken Verdünnung in der in-vitro Transkription nicht mehr gefunden werden.

3.4 Affinitätschromatographische Ansätze zur COPRA Anreicherung

3.4.1 Affinitätsreinigungs-Ansatz durch die PR-COPRA Interaktion

Die Aktivierung der PR vermittelten Transkription durch den Kofaktor COPRA läßt eine direkte oder indirekte Interaktion von COPRA mit dem PR vermuten. Sofern diese Interaktion stark genug ist, sollte es möglich sein, mit dem an Ni-NTA Agarose gekoppelten PR einen Rattenleber-Kernextrakt sowohl an COPRA wie auch an anderen stabil mit dem PR-Rezeptor interagierenden Kofaktoren zu depletieren (Abb. 4A). Dieser an COPRA verarmte Kernextrakt sollte nach Zugabe des PR ein geringeres Transaktivierungsvermögen auf einem PRE-Template als ein Kontroll-Kernextrakt in einer in-vitro Transkription aufweisen. Die Zugabe der von den Ni-NTA Beads eluierten PR-COPRA Fraktion müßte zudem das ursprüngliche Transaktivierungspotential wiederherstellen.

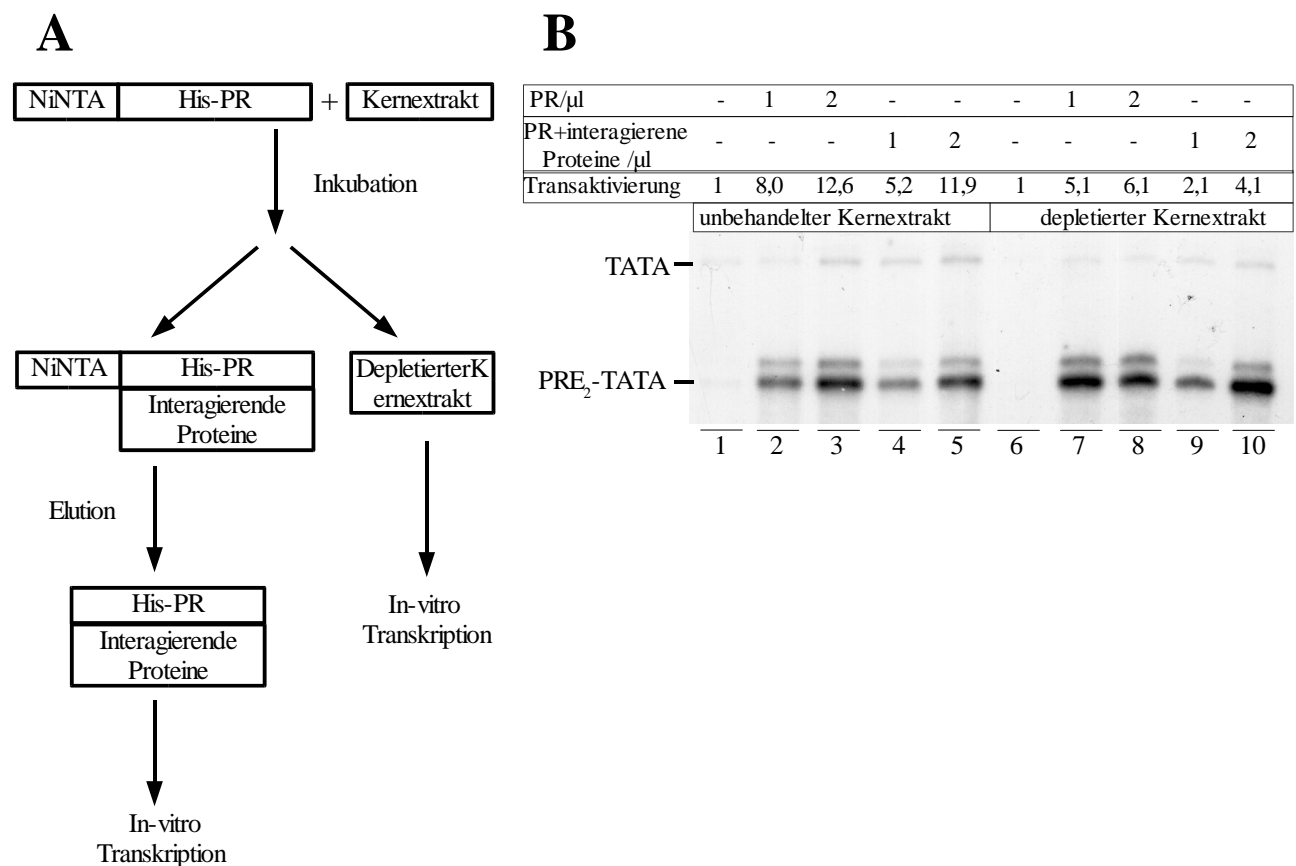


Abb. 4: Affinitätsreinigungs Ansatz von COPRA mittels des PR

- (A)** Rattenleber-Kernextrakt wurde mit an Ni-NTA Sepharose gebundenem, rekombinant erstelltem His-PR Fusionsprotein 1 h bei 4 °C inkubiert. Durch Zentrifugation wurden die Beads sedimentiert und so das His-PR Fusionsprotein und die möglichen interagierenden Proteine aus dem Kernextrakt entfernt. Die PR vermittelte Transaktivierungsfähigkeit des depletierten Kernextraktes wurde in einer in-vitro Transkription getestet (Abb. B, Spuren 6-10). Der an die Ni-NTA Matrix gebundene und in Kernextrakt vorinkubierte PR wurde eluiert und in einer in-vitro Transkription auf Koaktivatoraktivität getestet (Abb. B, Spuren 4,5,9,10).
- (B)** Zellfreie Transkription mit 4 μ l unbehandeltem (Spuren 1-5) bzw. mit 4 μ l durch den PR depletierten Rattenleber-Kernextrakt (Spuren 6-10) unter Zugabe von unbehandeltem PR (Spuren 2,3,7,8) bzw. mit im Kernextrakt vorinkubiertem PR (Spuren 4,5,9,10). 100 μ l Rattenleber-Kernextrakt wurde mit 144 μ g an Ni-NTA gebundenem PR 1 h bei 4 °C inkubiert. Der so vorinkubierte PR wurde von der Ni-NTA Matrix eluiert, dialysiert und in der zellfreien Transkriptionsreaktion eingesetzt (Spuren 4,5 und 9,10). Der so an PR interagierenden Proteinen depletierte Rattenleber-Kernextrakt wurde ebenfalls in der in-vitro Transkription eingesetzt (Spuren 6-10). Die Transkripte der basalen und der aktivierten Reporter sind markiert. Die PR vermittelte Transaktivierung (Quotient aktivierte / basale Transkription normalisiert auf die Kontrolle ohne PR) ist angegeben, wobei sich die Normalisierung der Transkripte in den Spuren 2-5 auf das Verhältnis der Transkripte in Spur 1 und in den Spuren 7-10 auf die Transkripte der Spur 6 bezieht.

Durch die Zugabe steigender Mengen an PR steigt die Transaktivierung in unbehandeltem Rattenleber-Kernextrakt auf einen Faktor 12,6 (Abb. 4B, Spure 3). Die Zugabe von in Kernextrakt vorinkubiertem PR, der bei stabiler COPRA Interaktion noch den Kofaktor gebunden haben könnte, zeigt keine verstärkte Transaktivierung (Abb. 4B, Spuren 4 und 5). Die Transaktivierung liegt auf demselben Niveau, wie mit dem unbehandelten PR (Abb. 4A, vergl. Spuren 2-3 mit Spuren 4-5). Da jedoch COPRA im Rattenleber-Kernextrakt in sättigenden Konzentrationen enthalten sein

könnte, kann möglicherweise eine weitere Steigerung der PR vermittelten Transkriptionsaktivierung durch die exogene Zugabe von COPRA zu der in-vitro Transkription nicht erreicht werden. Ein durch den PR möglicherweise an Kofaktoren depletierter Rattenleber-Kernextrakt transaktiviert jedoch bei Zugabe von unbehandeltem PR auch weiterhin, wenn auch leicht schwächer wie der unbehandelte Kernextrakt (Abb. 4A, vergl. Spuren 1-3 mit 6-8). Der vorinkubierte, möglicherweise Kofaktor-bindende PR zeigt auch in dem depletierten Kernextrakt kein größeres Transaktivierungspotential als der unbehandelte PR (Abb. 4B, vergl. Spuren 7-8 mit Spuren 9-10). Eine direkte Interaktion von COPRA mit dem PR konnte daher mit diesem Experiment nicht nachgewiesen werden.

3.4.2 Affinitätsreinigungs-Ansatz von COPRA durch CBP Komplexe

Wie Naar et al., 1998 zeigen konnte, reichen die Aminosäuren 1-50 für die Interaktion des „sterol-responsive-element-binding proteins“ (SREBP-1a) mit dem „cAMP-responsive-element-binding protein binding-protein“ (CBP) aus. Mit einem GST-SREBP-1a(As 1-50) Fusionsprotein, welches an Glutathion-Sepharose gebunden war, konnten so aus einem HeLa Zellextrakt mehrere interagierende Proteine in den Größen 30-280 kD, unter anderem auch CBP, isoliert werden. CBP gilt als Kointegratorprotein, da es mit diversen weiteren an Koaktivatorprozessen beteiligten Proteinen, wie z.B. mit dem „steroid-receptor-coactivator 1“ (SRC-1) oder mit dem „p300/CBP-associated factor“ (PCAF), interagiert und mit diesen unterschiedliche Aktivator-Multiprotein-komplexe an Promotoren bildet (Ikeda et al., 1999; Yang et al., 1996, Chen et al., 1997).

Um zu überprüfen, ob eventuell COPRA ein Bestandteil dieses Komplexes ist, wurden aus einer HeLa cDNA Bank mittels PCR die ersten 50 DNA Tripletts der kodierenden Region von SREBP-1a vervielfältigt, in einen bakteriellen Expressionsvektor umkloniert und das Protein rekombinant als GST-Fusionsprotein erstellt. Mit diesem an Glutathionsepharose gebundenen GST-SREBP-1a (As 1-50) Protein wurde nun ein Rattenleber-Kernextrakt an CBP Komplexen depletiert (Abb. 5A) und die interagierenden Proteine mittels SDS-Proteingel aufgetrennt. Abbildung 5B zeigt, daß die GST-SREBP-1a (As 1-50) Beads mit einigen Proteinen des Rattenleber-Kernextraktes in der Größe von ca. 100 bis 300 kD interagieren (Spur 3). Im Vergleich dazu bindet an ein rekombinant erstelltes GST-CAP350(As 1-1928) Fusionsprotein nur ein Protein von ca. 70 kD Größe (vergleiche Spur 3 mit 4), welches möglicherweise bakteriellen Ursprungs ist.

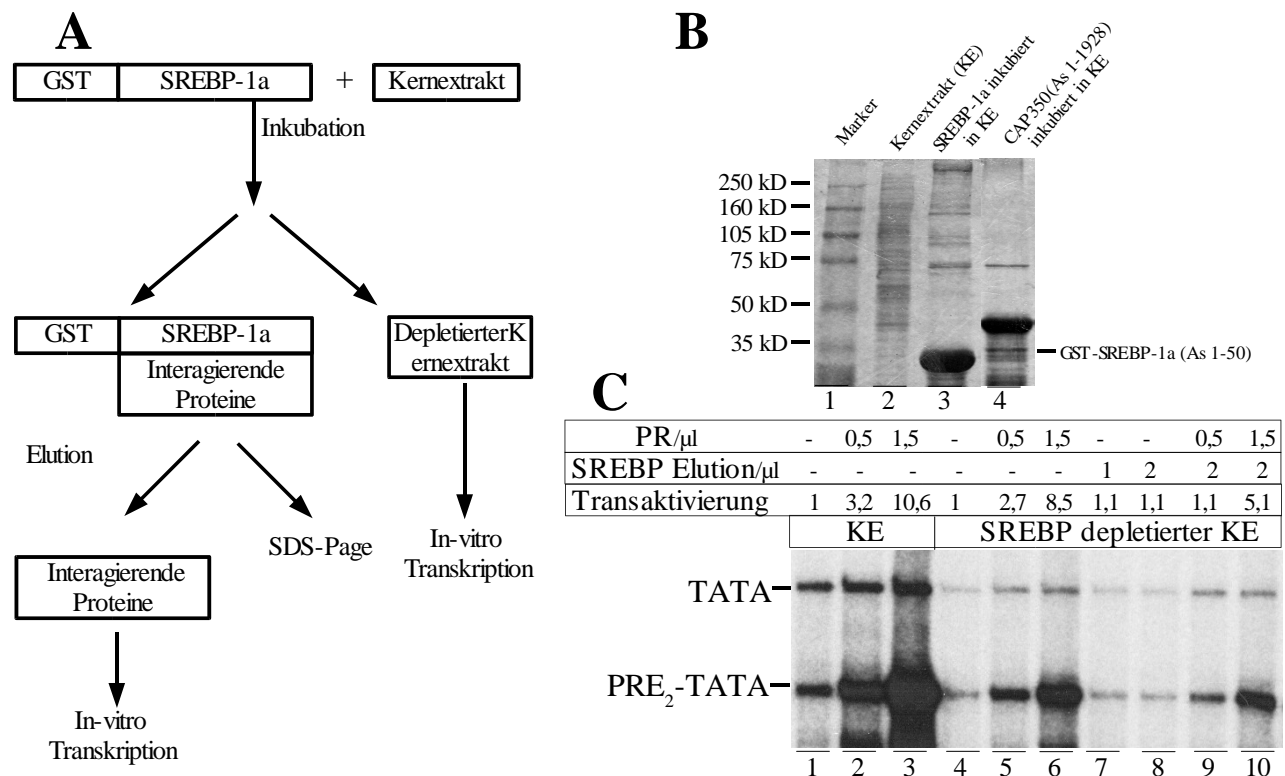


Abb. 5: Affinitätsreinigungs Ansatz von COPRA durch CBP-Komplexe

(A) Rattenleber-Kernextrakt wurde mit an Glutathionsepharose gebundenen rekombinant erstellten GST-SREBP-1a(As 1-50) Fusionsprotein 1 h bei 4 °C inkubiert. Durch Zentrifugation wurden die Beads sedimentiert und so das GST-SREBP-1a(As 1-50) Fusionsprotein und die interagierenden CBP-Komplexe aus dem Kernextrakt entfernt. Die PR vermittelte Transaktivierungsfähigkeit des depletierten Kernextraktes wurde in einer in-vitro Transkription getestet (Abb. C, Spuren 4-10). Die an das Fusionsprotein gebundenen CBP-Komplexe wurden durch eine SDS-Page analysiert (Abb. B) bzw. wurden die interagierenden Proteine eluiert und auf Koaktivatoraktivität in einer in-vitro Transkription getestet (Abb. C, Spuren 7-10).

(B) Proteinnachweis mittels 8 %-SDS Page mit anschließender Silberfärbung. GST-SREBP1-a(As 1-50) bzw. GST-CAP350(As 1-1928), gebunden an Glutathionsepharose, wurde in Rattenleber-Kernextrakt inkubiert, gewaschen und die an die Fusionsproteine gebundenen Proteine in einer SDS-Page aufgetrennt (Spuren 3,4, vergl. Abb. 5A). Als Kontrolle wurde unbehandelter Rattenleber-Kernextrakt in Spur 2 aufgetragen. Proteingrößen Standards sind angegeben.

(C) Zellfreie Transkription mit 4 μ l (Spuren 1-3) Rattenleber-Kernextrakt, bzw. mit 5 μ l durch GST-SREBP1-a(As 1-50) depletierten Rattenleber-Kernextrakt (Spuren 4-10) unter Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen des PR und unterschiedlicher Konzentrationen von GST-SREBP1-a(As 1-50) interagierenden Proteinen aus Kernextrakt. Die PR vermittelte Transaktivierung (Quotient aktivierte / basale Transkription normalisiert auf die Kontrolle ohne PR) ist angegeben.

In der in-vitro Transkription transaktiviert ein mit GST-SREBP-1a(As 1-50) behandelter, an CBP-Komplexen depletierter, Kernextrakt PR vermittelt um einen Faktor von 8,5, im Vergleich zu der Transaktivierung in unbehandeltem Kernextrakt von 10,6 (Abb. 5C, vergleiche Spuren 2-3 und 5-6). Die Zugabe der von den GST-SREBP-1a(As 1-50) Beads eluierten CBP-Komplexe führte weder ohne Zugabe des PR, noch nach Zugabe des PR zu einer verstärkten Transaktivierung (Spuren 7-10). Die PR-vermittelte Transaktivierung ist nach Zugabe der eluierten CBP-Komplexe sogar geringer als ohne die Zugabe (vergleiche Spuren 5-6 mit 9-10), so daß eine direkte Interaktion von COPRA mit CBP-Komplexen oder überhaupt von für die in-vitro Transkription essentiellen Kofaktoren mit SREBP-1a nicht nachgewiesen werden konnte.

3.5 Charakterisierung der für die COPRA Wirkung notwendigen PR Domänen

3.5.1 Der Einfluß der Helix 12 des PR auf die COPRA Aktivität

Koaktivatoren wie z.B. SRC-1 und CBP sind für die Stimulierung der Transkription des PR notwendig, wobei die Ligand abhängige Interaktion zwischen dem Steroidrezeptoren und den Koaktivatoren von der Aktivierungsfunktion 2, die die Helix 12 umfaßt, abhängig ist (Henttu et al., 1997). Die Helix 12 des PR interagiert in der aktiven Position sowohl mit dem gebundenen Hormon als auch mit Kofaktoren auf der Oberfläche, wohingegen die Bindung des Antiprogestins RU486 zu einer Umgruppierung der Helix 12 führt und so eine Koaktivatorbindung verhindert (Tanenbaum et al., 1998).

Um zu überprüfen, ob diese Helix des PR auch für die COPRA Wirkung notwendig ist, wurde eine PR Mutante erstellt, bei der diese Helix so mutiert war, daß diese sich nicht mehr ausbilden konnte. Hierzu wurde die Glutaminsäure an Position 911 zu Alanin mutiert. Wie Gong et al. (1997) zeigen konnten, ist diese Mutante nicht in der Lage in-vivo die Transkription zu aktivieren, jedoch bindet diese Mutante vergleichbar mit dem Wild-Typ Rezeptor-DNA und Hormon und wirkt so in-vivo dominant negativ.

In dem von Dr. Klotzbücher aufgestellten Modell (Abb. 6A) kommt es in Abwesenheit von COPRA zu einer intramolekularen Interaktion zwischen der AF1 und der AF2 des PR oder zu einer Interaktion eines Repressors mit der AF1 und der AF2 des PR. In dieser inaktiven Form könnten die Aktivierungsfunktionen somit entweder durch den Repressor oder aber auch durch diese intramolekulare Interaktion maskiert sein. Dr. Klotzbücher konnte zudem durch eine C-terminal deletierte Mutante zeigen, daß in Abwesenheit der C-terminalen Repressionsfunktion bzw. der Repressorbindestelle diese Deletionsmutante COPRA unabhängig über die Aktivierungsfunktionen 1 und 3 aktivieren konnte (Abb. 6A, unten). Somit konnte er nachweisen, daß die AF2 und somit möglicherweise die Helix 12 des PR an der Kofaktorwirkung von COPRA beteiligt ist.

Um die Rolle der Helix 12 bei der PR vermittelten Transaktivierung zu testen, wurde zunächst eine in-vitro Transkription in einem COPRA enthaltenden Rattenleber-Kernextrakt mit der PR Mutante E911A durchgeführt (Abb. 6B). Die Mutante PR E911A aktivierte konzentrationsabhängig die in-vitro Transkription auf dem PRE₂-TATA Template um einen Faktor von maximal 13,6 (vergleiche Spur 1 mit den Spuren 2-3) und zeigte somit ein deutliches mit dem Wildtyp PR vergleichbares Aktivierungspotential (vergleiche Abb. 6B Spur 3 mit Abb. 1C Spur 3).

Um die repressorischen Eigenschaften der C-terminal gelegenen Helix 12 des PR in Abwesen-

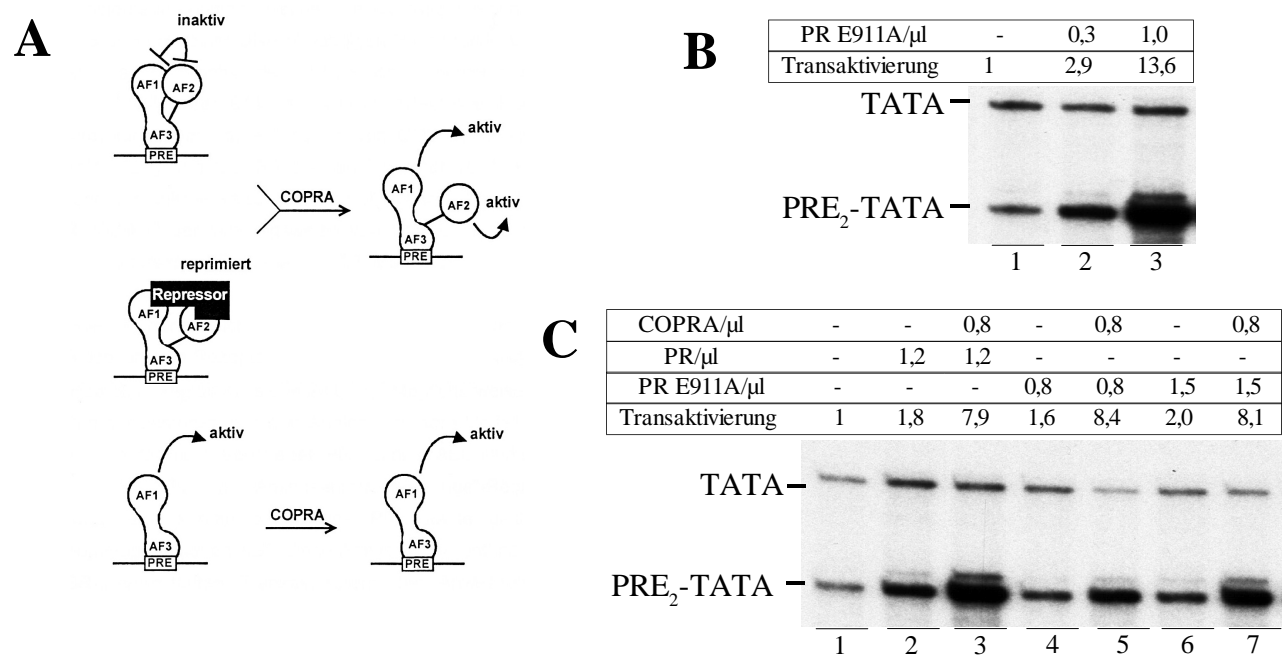


Abb. 6: Charakterisierung der Wirkungsweise von COPRA

- (A)** Schematische Darstellung des von Klotzbücher et al., 1997 beschriebenen COPRA vermittelten PR Aktivierungsmechanismus. In Abwesenheit von COPRA liegt der an DNA gebundene PR in einer inaktiven Konformation vor, die entweder durch einen Repressor oder durch intramolekulare Wechselwirkungen hervorgerufen wird. In dieser inaktiven Form sind die Aktivierungsfunktionen AF1 und AF2 „maskiert“ und tragen nicht zur Aktivierung bei. Eine C-terminale PR Deletionsmutante, die defizient an der Repressorbindestelle bzw. der Repressordomäne ist, aktiviert COPRA unabhängig über die AF1 und AF3.
- (B)** Zellfreie Transkription in 4 μl Rattenleber-Kernextrakt unter Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen der PR Mutante E911A. Die Transkripte der basalen und der aktivierten Reporter sind markiert. Die PR vermittelte Transaktivierung (Quotient aktivierte/basale Transkription normalisiert auf die Kontrolle ohne PR) ist angegeben.
- (C)** Rekonstituiertes zellfreies Transkriptionssystem mit 0,7 μl DEAE-Fraktion AB, 2 μl DEAE-Fraktion DA, 2,5 μl RNAPII MonoQ-Fraktion und 60 ng TFIIE und 90 ng TFIIF unter Zugabe von PR (Spuren 2,3) bzw. der PR Mutante PR E911A (Spuren 4-7). Die Transkriptionsreaktionen der Spuren 3,5,7 enthalten zusätzlich 0,8 μl der COPRA haltigen DEAE-Sepharosefraktion CC. Die Transkripte der basalen und der aktivierten Reporter sind markiert. Die PR vermittelte Transaktivierung (Quotient aktivierte/basale Transkription normalisiert auf die Kontrolle ohne PR) ist angegeben.

heit von COPRA zu eruieren, wurde die Transaktivierungsfähigkeit der PR E911A Mutante im rekonstituierten System überprüft (Abb. 6C). Auch diese Mutante ist wie der Wildtyp-PR nicht in der Lage die Transkription COPRA unabhängig zu aktivieren. Erst nach der Zugabe einer COPRA haltigen Fraktion konnte die PR E911A Mutante genauso wie der PR transaktivieren (vergleiche Spuren 2-3 mit 4-5 bzw. mit 6-7).

Dieses Experiment zeigt, daß die Molekül-überspannende Lage der intakten Helix 12 zum einen nicht für die COPRA Aktivierung notwendig ist und zum anderen nicht an der Maskierung der Aktivierungsfunktion 1 und 2 des PR ohne COPRA beteiligt ist. Die von Dr. Klotzbücher eingesetzte COPRA unabhängige C-terminal deletierte PR Mutante ist demnach nicht auf Grund des Fehlens einer intakten Helix 12 COPRA unabhängig, sondern auf Grund des Fehlens anderer wichtiger deletierter Aminosäuresequenzen im C-Terminus.

3.5.2 Squelchingexperimente zur Bestimmung der für die COPRA Wirkung notwendigen PR Domänen

Eine PR Deletionsmutante, die auf Grund fehlender DNA Bindedomäne nicht aktivieren kann, könnte trotzdem mit COPRA interagieren. Gibt man zu einer durch den PR aktivierten in-vitro Transkriptionsreaktion eine solche selber nicht aktivierende PR Mutante hinzu, könnte die Wirkung des PR durch die mögliche Interaktion von COPRA mit der inaktiven PR-Mutante konzentrationsabhängig beeinflusst werden. Durch die Verwendung unterschiedlicher nicht DNA-bindungsfähiger PR-Deletionsmutanten sollte der Bereich des PR, der für die COPRA Wirkung notwendig ist, eingegrenzt werden.

Die Mutante AB Δ core wurde hierzu im Baculovirussystem erstellt und mit Ni-NTA Agarose gereinigt. Die AB Δ core Mutante umfaßt die AF1 mitsamt der modulierenden Region, aber ohne die core Domäne (Abb. 7A). Im Kernextrakt sollte die Mutante AB Δ core auf Grund der fehlenden DNA Bindedomäne nicht in der Lage sein, die Transkription zu aktivieren. Dies bestätigt sich in der in-vitro Transkriptionsreaktion (Abb. 7B). Selbst bei hohen Konzentrationen von AB Δ core kommt es zu keiner signifikanten Aktivierung der Transkription (vergleiche Spuren 1-2 mit 3-6). Die fehlende DNA Bindung inaktiviert somit diese Mutante erwartungsgemäß.

Die Zugabe der PR Mutante AB Δ core zu einer durch den Wildtyp-PR aktivierten Transkription führt allerdings nicht zu einer konzentrationsabhängigen Verminderung der Transaktivierungsfähigkeit des PR (vergleiche Spur 2 mit 7-10). Eine quantitative Auswertung der Transaktivierung des PR alleine ergab einen Faktor von 16,8, nach Zugabe der PR Mutante AB Δ core lag die Transaktivierung des PR bei 16 bis 19. Dies läßt den Schluß zu, daß es nicht zu einer stabilen PR-COPRA Interaktion in der AF1 kommt.

Um die für die COPRA Wirkung notwendigen C-terminalen Bereiche des PR zu analysieren, wurden C-terminal GST-fusionierte PR-Fragmente in Bakterien exprimiert und durch die Bindung an Glutathion-Sepharose 4B gereinigt.

Die PR Deletionsmutante GST-DE enthält die vollständige Hormonbindedomäne und die AF2 des PR wohingegen die Deletionsmutante GST-D Δ E nur noch die Homologieregion D umfaßt (Abb. 7A). Die so exprimierten PR Mutanten besaßen keine DNA-Bindedomäne und sollten demnach nicht aktivierend bei der in-vitro Transkription wirken können.

In einer in-vitro Transkription in Rattenleber-Kernextrakt zeigte sich zum einen, daß die PR Mutanten GST-DE und GST-D Δ E wie erwartet nicht aktivierend wirken (Abb. 7C, vergleiche Spuren 1-2 mit 3-5 und 6-8), zum anderen allerdings auch, daß beide Mutanten nicht in der Lage

sind, die PR Aktivität konzentrationsabhängig zu vermindern (vergleiche Spur 2 mit 9-11 und 12-14). Die Transaktivierung des PR auf dem PRE₂-TATA Reporter liegt bei einem Faktor 8, wohingegen nach Zugabe der beiden PR-Fragmente Aktivierungen von 6 bis 8,4 gemessen werden können, was keinen signifikanten Unterschied darstellt.

Demnach konnte für diese beiden C-terminalen PR-Deletionsmutanten eine stabile Interaktion von COPRA bzw. anderen Kofaktoren mit dem PR nicht nachgewiesen werden.

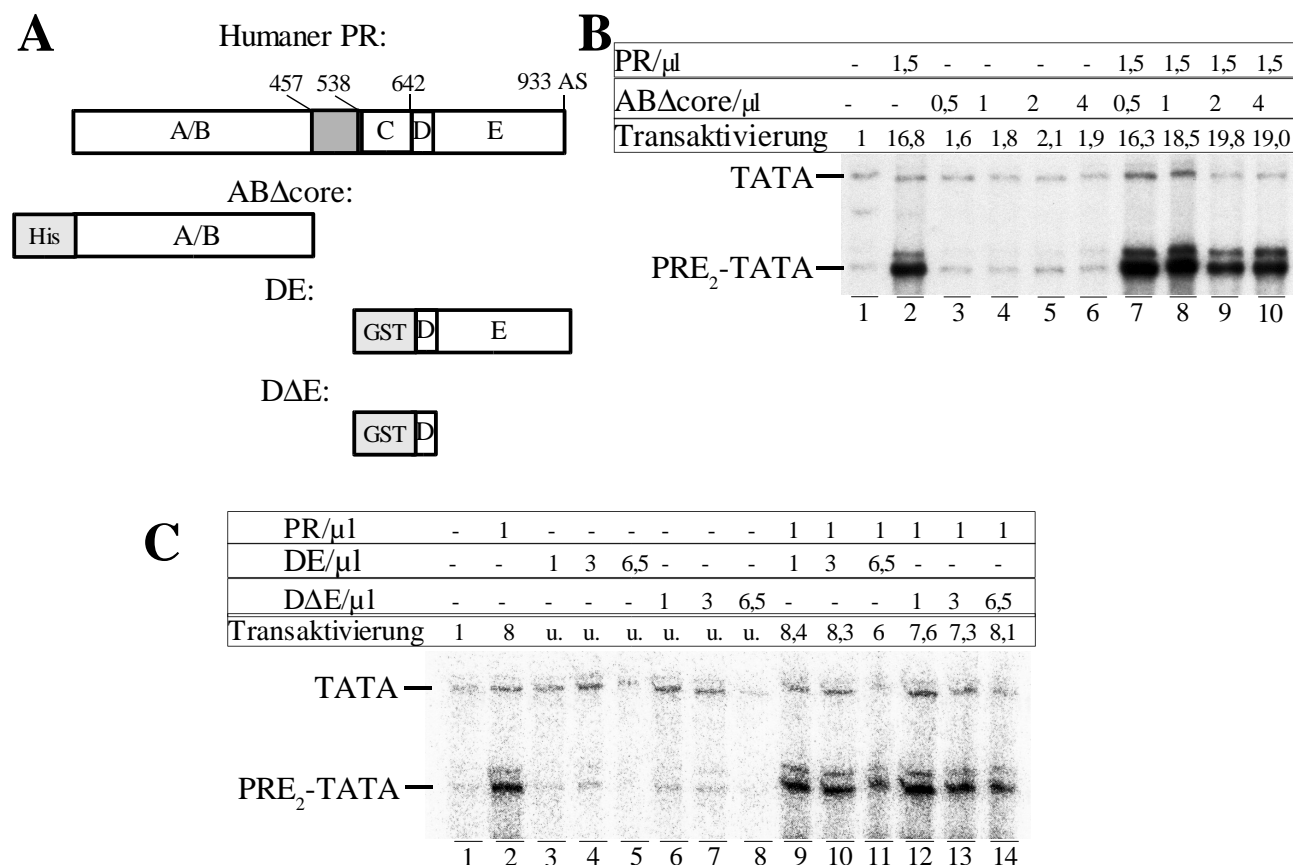


Abb. 7: Squelching-Experimente mit PR-Deletionsmutanten

- (A) Dargestellt ist die Domänenstruktur des humanen Progesteron-Rezeptors (PR) mit den Homologieregionen A/B bis E nach Meyer et al., 1992. Die PR-Aminosäuresequenzen, die in dem His-Tag Deletionsfusionsprotein ABΔcore bzw. den GST-Tag Deletionsfusionsproteinen DE und DΔE noch enthalten sind, sind schematisch dargestellt.
- (B) Zellfreie Transkription mit 4 μl Rattenleber-Kernextrakt unter Zugabe von rekombinantem PR (Spuren 2,7-10) und unterschiedlichen Konzentrationen der PR Deletionsmutante ABΔcore (Spuren 3-10). Die Transkripte der basalen und der aktivierten Reporter sind markiert. Die Transaktivierungen, berechnet als Verhältnis der PRE₂ TATA Transkripte zu den TATA Transkripten, normalisiert auf die Kontrolle ohne rekombinante Aktivatoren, (Spur 1) sind angegeben.
- (C) Zellfreie Transkription mit 4 μl Rattenleber-Kernextrakt unter Zugabe von rekombinantem PR (Spuren 2, 9-14) und unterschiedlichen Konzentrationen der PR Fragmente DE und DΔE (Spuren 3-14). Die Transkripte der basalen und der aktivierten Reporter sind markiert. Die Transaktivierungen, berechnet als Verhältnis der PRE₂-TATA Transkripte zu den TATA Transkripten, normalisiert auf die Kontrolle ohne rekombinante Aktivatoren, (Spur 1) sind für die aktivierten Transkriptionen der Spuren 2 und 9-14 angegeben, bei den Spuren 3-8 auf Grund der zu schwachen Transkripte unbestimmt (u.).

3.6 Analyse des Einflusses von COPRA auf den PR im Chromatinumfeld

3.6.1 Analyse von in-vitro assembliertem Chromatin

Im Zellkern liegt die DNA in Chromatinstruktur verpackt vor. Daher spiegelt die in-vitro Transkription die zellulären Verhältnisse nur unvollständig wieder, da in der in-vitro Transkription die DNA „nackt“ vorliegt. Inzwischen sind diverse Faktoren bekannt, die die Chromatinstruktur beeinflussen. Aufgelockert wird die Chromatinstruktur vor allem durch acetylierende Faktoren, wie z.B. pCAF, CBP und p300 (Ogryzko et al., 1996; Yang et al., 1996) oder durch Faktoren, die ATP abhängig die Nukleosomen umpositionieren, wie z.B. die Multiproteinkomplexe SWI/SNRF, ACF und CHRAC (Cairns et al., 1994; Peterson et al., 1995; Tsukiyama and Wu, 1995; Varga-Weisz et al., 1995; Pazin et al., 1997). Für die Dekondensation werden im allgemeinen deacetylierende Faktoren, wie z.B. HDAC1, HDAC2 und HDAC3 (Hassig et al., 1998), verantwortlich gemacht.

Ein bei der in-vitro Transkription gefundener Kofaktor könnte demnach in dem zellulären Umfeld neben der eigentlichen Aktivierung noch weitere Aufgaben erfüllen, indem er z.B. selber die Chromatinstruktur durch Acetylierung auflockert oder weitere Faktoren, die für die Auflockerung notwendig sind, an den Promotor dirigiert.

Um die Wirkungsweise von COPRA in einem Chromatinumfeld zu analysieren, wurden die entsprechenden Reporterkonstrukte vor der in-vitro Transkription mit Hilfe von *Xenopus* Oocytenextrakten, die den Histon-Pool und die an der Chromatinverpackung beteiligten Proteine liefern, in Chromatin verpackt und erst dann zur Transkription eingesetzt.

Die Qualität des erstellten Chromatins kann mit Hilfe eines limitierenden Micrococcal-Nuklease (MNase) Verdaus getestet werden. Die MNase schneidet die DNA relativ unspezifisch. In Chromatin kann sie jedoch nur zwischen den einzelnen Nukleosomen in der Linkerregion schneiden. Der von einem Nukleosom abgedeckte DNA Bereich ist 146 bp lang, für die MNase unzugänglich und so vor dem Verdaus geschützt. Ist ein Plasmid vollständig in Chromatin verpackt, sollte die MNase nur in den entsprechenden Linkerregionen schneiden können. Bei einem limitierenden MNaseverdaus, bei dem die MNase also nicht jede Linker DNA schneidet, sollten die entstehenden DNA Fragmente alle ein Vielfaches der durch die Nukleosomen geschützten DNA und den nicht verdauten Linkerregionen groß sein. Trägt man einen solchen limitierenden Verdaus nach vorangegangenen Proteinase K Verdaus auf einem Agarosegel auf und detektiert die entstandenen Fragmente in einem Southern Blot mittels radioaktiv markierter Sonden, so sollte man ein „Leitermuster“ detektieren können, was sich immer weiter in Richtung einer einzigen Bande, den geschützten Mononukleosomen, verschiebt, je länger der Verdaus durchgeführt wird. Je länger die Leiter bei diesem limitierenden Verdaus ist, desto besser ist die Qualität des erstellten

Chromatins, da bei unvollständiger Verpackung der Abstand der einzelnen Nukleosomen nicht gleichmäßig ist, und man so bei einem limitierenden MNaseverdau nicht dieses Leitmuster gleichmäßig größer werdender DNA Fragmenten erhält.

In Abb. 8A ist ein solcher limitierender, nach unterschiedlichen Verdauzeiten gestoppter MNaseverdau dargestellt. Man erkennt deutlich bis zu 7 positionierte Nukleosomen. Dies läßt den Schluß zu, daß das Reporterplasmid zwar nicht zu 100 % in positionierte Nukleosomen, aber ein Großteil des Plasmides verpackt ist. In einer Chromatinassembly Reaktion mit nicht fraktionierten *Xenopus* Oocytenextrakt ist allerdings auch keine bessere Nukleaseleiter zu erwarten. Eine MNaseverdau-Leiter, die 7 positionierte Nukleosomen darstellt (Abb. 8A), zeigt demnach ein erwartungsgemäß gut verpacktes Plasmid.

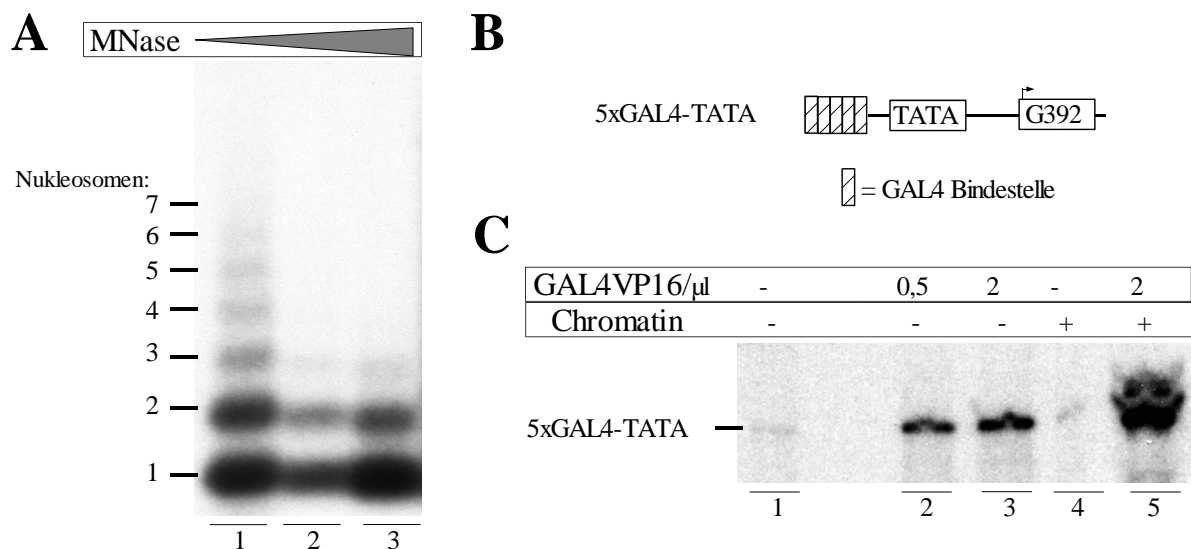


Abb. 8: Analyse von in-vitro erstelltem Chromatin

- (A) Das 5xGAL4-TATA Plasmid (Abb. B) wurde unter Zugabe von *Xenopus*-Oocytenextrakt in Chromatin verpackt und einem MNaseverdau unterzogen, der nach 2 (Spur 1), 5 (Spur 2) bzw. 10 min (Spur 3) durch Zugabe von EDTA und anschließendem Proteinase K Verdau gestoppt wurde. Die Auftrennung der DNA erfolgte auf einem 1,5 % Agarosegel, die Detektion durch Southernblot Hybridisierung mit geeigneten radioaktiv markierten Sonden und anschließender Autoradiographie. Die erkennbaren Nukleosomen sind markiert.
- (B) Schematische Darstellung des in der zellfreien Chromatintranskription (C) und im MNaseverdau (A) eingesetzten Reporterkonstruktes. Vor der TATA Box aus dem MLP Promotor wurden 5 synthetische GAL4 Bindestellen inseriert. Die G-freie Kassetten (G392) besteht aus 392 bp.
- (C) Zellfreie Transkription auf dem Reporterkonstrukt 5xGAL4-TATA (Spuren 1-3), bzw. auf dem in Chromatin verpackten Reporterkonstrukt 5xGAL4-TATA (Spuren 4,5), sowie unter Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen des rekombinant erstellten Aktivators GAL4VP16 (Spuren 2,3,5). Die Transkripte sind markiert.

Da von dem Fusionsprotein Gal4VP16 bekannt ist, daß dieses Protein auf chromatinverpackter DNA binden kann und die Transkription auf Chromatin stark aktiviert (Laybourn and Kadonaga, 1992), wurde ein Reporterkonstrukt (5xGAL4-TATA) mit 5 Gal4 Bindestellen in Anwesenheit von oder als Kontrolle ohne Gal4VP16 bei der in-vitro Transkription eingesetzt. Auch dieses Konstrukt enthält eine G-freie Kassette von 392 nt Länge, die in der in-vitro Transkription detektiert werden (Abb. 8B).

Ohne die Zugabe von Gal4VP16 ist die basale Transkription auf „nackter“ DNA so gering, daß sie in der Autoradiographie nur schwach nachgewiesen werden kann (Abb. 8C, Spur 1). Die Zugabe des Aktivators stimuliert die Transkription auf „nackter“ DNA so stark, daß ein Transkript von der erwarteten Länge nachgewiesen werden kann (vergleiche Spur 1 mit Spuren 2,3). Die Transaktivierung nach Zugabe von Gal4VP16 ist hoch, aber nicht quantifizierbar, da die basale Aktivität für eine quantitative Auswertung zu schwach ist. Die basale Aktivität auf dem in Chromatin verpackten Reporterkonstrukt ist vergleichbar schwach wie die basale Aktivität auf der „nackten“ DNA (vergleiche Spuren 1 und 4). Die Zugabe des Aktivators GAL4VP16 bewirkt auf Chromatin jedoch eine vergleichsweise stärkere Aktivierung als auf „nackter“ DNA (vergleiche Spur 3 und 5). Das so erstellte Chromatin zeigt demnach die erwartete Eigenschaft, da es eine stark verstärkte Transaktivierung durch den GAL4VP16 Aktivator im Vergleich zu der Transaktivierung auf nicht Chromatin verpackter DNA zeigt (Laybourn and Kadonaga, 1992). Demnach scheint die Qualität des erstellten Chromatins für die in-vitro Transkription ausreichend gut zu sein.

3.6.2 Analyse des Einflusses von COPRA auf die nukleosomale Struktur

Gibt man zu der Chromatinverpackungsreaktion Gal4VP16 oder den PR hinzu, so könnten diese DNA-bindenden Proteine eventuell auch während der Verpackungsreaktion an die DNA binden und so eventuell in der Nachbarschaft der jeweiligen Bindestellen die Nukleosomen positionieren, einen Aufbau der Nukleosomen verhindern oder die Nukleosomen verschieben.

Um zu überprüfen, ob COPRA einen Einfluß auf die Nukleosomenstruktur hat, wurden MNase Verdaureaktionen in Anwesenheit bzw. Abwesenheit des PR oder Gal4VP16 und unter Zugabe einer COPRA enthaltenden Fraktion durchgeführt (Abb. 9). Bei der Detektion der Signale wurden nun Sonden verwendet, die entweder genau den Promotorbereich, um die Nukleosomenstruktur in der Nähe der entsprechenden DNA-Bindestellen zu analysieren, abdecken, oder es wurden 5'-downstream gelegene Sonden („Backbonesonden“) verwendet, die den entfernt vom Promotor gelegenen Teil des Plasmidgerüsts abdecken. Das für diesen MNaseverdaul eingesetzte Reporterkonstrukt enthält im Promotorbereich sowohl 5 Gal4 Bindestellen als auch 4 PREs.

Ohne die Zugabe eines DNA bindenden Faktors erkennt man die erwartete regelmäßige

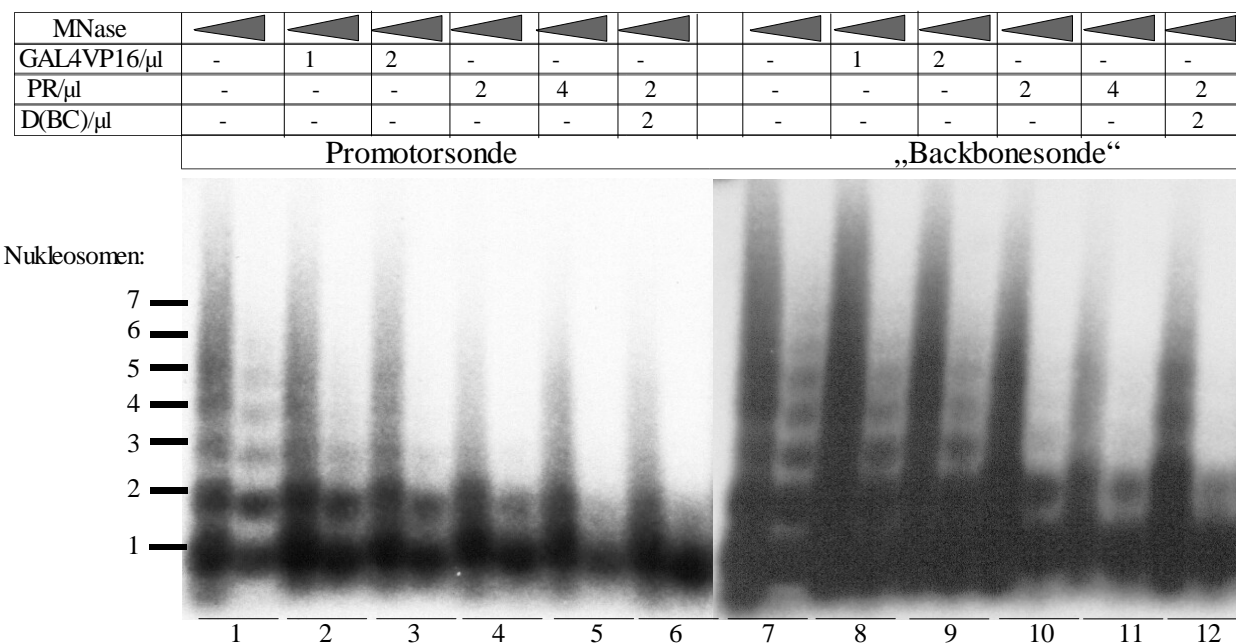


Abb. 9: Detektion der in MNaseverdauen unter Zugabe von GAL4VP16 und PR entstandenen DNA Fragmente mit unterschiedlichen Sonden

Ein PR und GAL4 Bindestellen enthaltendes Plasmid wurde mit *Xenopus* Oocytenextrakten in Chromatin verpackt, wobei unterschiedliche Konzentrationen von GAL4VP16 und PR oder PR zusammen mit einer COPRA enthaltenden Fraktion eingesetzt wurden. Der anschließende MNaseverdau wurde nach 1 bzw. 5 min gestoppt, die Proteine verdaut, die entstandenen DNA Fragmente auf einem 1,5 % Agarosegel aufgetrennt und durch Southernblot detektiert. Die Hybridisierung erfolgte mit radioaktiv markierten Sonden, die entweder im Promotorbereich (Spuren 1-6) oder im Plasmid Backbone (Spuren 7-12) des in der Chromatinverpackung eingesetzten Plasmids hybridisieren. Detektiert wurden die Fragmente mittels einer Autoradiographie. Die erkennbaren nukleosomalen Banden sind markiert.

Nukleosomenstruktur im Promotorbereich (Spur 1). Die Zugabe von Gal4VP16 vermindert die Anzahl der sichtbaren Nukleosomen von 7 auf 4, bzw. bei großen Konzentrationen von Gal4VP16 auf 3 (Spuren 2,3). Die Zugabe des PR bewirkt eine starke Verminderung der sichtbaren Nukleosomen; bei hoher PR Konzentration erkennt man im Gegensatz zu Gal4VP16 jedoch nur noch ein Mononukleosom (Spuren 4,5). Die Zugabe einer COPRA enthaltenden Fraktion zusammen mit dem PR führt zu keiner weiteren signifikanten Veränderung der Nukleosomenstruktur (vergleiche Spur 4 mit 6). Bei der Detektion der in dem MNase-Verdau nukleosomal geschützten DNA Fragmente mit einer Sonde, die den 5'-downstream gelegenen Bereich des Plasmides abdeckt, führt die Zugabe von Gal4VP16 zu keiner Änderung der Nukleosomenstruktur (vergleiche Spure 7 mit 8, 9), wohingegen die Zugabe auch geringer Konzentrationen des PR auch in diesem entfernt von den PRE detektierten Bereich einen starken Einfluß auf die Struktur zeigt (Spuren 10,11). Der Einfluß des PR auf entfernt von den PRE liegende Bereiche wird jedoch wahrscheinlich durch unspezifische DNA Bindung des PR, möglicherweise jedoch auch durch Nukleosomen „remodelling“ über größere Distanzen hervorgerufen. Die Zugabe einer COPRA haltigen Fraktion zusätzlich zu der Zugabe des PR hat im „Backbonebereich“ des Plasmids ebenfalls keinen Einfluß auf die Nukleosomenstruktur (vergl. Spuren 10 mit 12).

3.6.3 Analyse der COPRA Wirkung bei der PR vermittelten Transaktivierung in der in-vitro Chromatintranskription

Um den Einfluß von COPRA bei der eigentlichen in-vitro Chromatintranskription zu testen, wurde eine Chromatintranskriptionsreaktion in Rattenleber-Kernextrakt durchgeführt. Hierzu wurden der PR bzw. zusätzlich auch noch eine COPRA enthaltende Fraktion beim Assembly bzw. kurz vor der Transkriptionsreaktion zugegeben. Die Zugabe des PR und einer COPRA haltigen Fraktion während des Assemblys könnte eine gerichtete Positionierung der Nukleosomen, ähnlich wie auf dem „mouse mammary tumor virus“ (MMTV) Promotor gezeigt (Truss et al., 1995), auf dem Reporterkonstrukt bewirken und so eine verstärkte Transkriptionsaktivierung ermöglichen. Da der PR in-vivo auch die PRE auf Chromatin verpackter DNA binden kann, wurde zudem auch die Wirkung des PR und einer COPRA haltigen Fraktion auf zuvor in Chromatin verpackter DNA in der in-vitro Chromatintranskriptionsreaktion analysiert.

Ähnlich der in Abb. 8C gezeigten Chromatintranskription ist die basale Aktivität hier nicht zu detektieren (Abb. 10, Spur 1). Auch die Zugabe des PR oder des PR zusammen mit einer COPRA haltigen Fraktion bei der Assemblyreaktion bewirkten keine meßbare Erhöhung der Transkriptionsrate (Spuren 2,3). Erst die Zugabe des PR direkt zu der Transkriptionsreaktion bewirkt eine solche Erhöhung der Transkriptionsrate, daß diese detektierbar ist (Spuren 5 und 6). Die Zugabe einer COPRA haltigen Fraktion scheint die Aktivität der PR vermittelten Transkriptionsrate in etwa zu verdoppeln (vergleiche Spur 4 mit 5). Die COPRA haltige Fraktion alleine zeigt jedoch auch eine geringe Verstärkung der basalen Aktivität (vergleiche Spur 1 mit 6). Dies deutet darauf hin, daß in der COPRA haltigen Fraktion noch weitere Chromatintranskription aktivierende Faktoren vorliegen.

Die zusätzlich zu dem COPRA haltigen Kernextrakt zugegebene COPRA Fraktion verstärkt die Aktivierung der PR vermittelten Transkription auf Chromatin Templates deutlich. Da die COPRA haltige Fraktion jedoch auch ohne Zugabe des PR die Transkription aktiviert, ist nicht nachweisbar, ob der aktivierende Effekt auf die PR vermittelte Transaktivierung auf Chromatin durch COPRA oder durch eine allgemeine Stimulierung der Chromatintranskription durch andere Faktoren hervorgerufen wird.

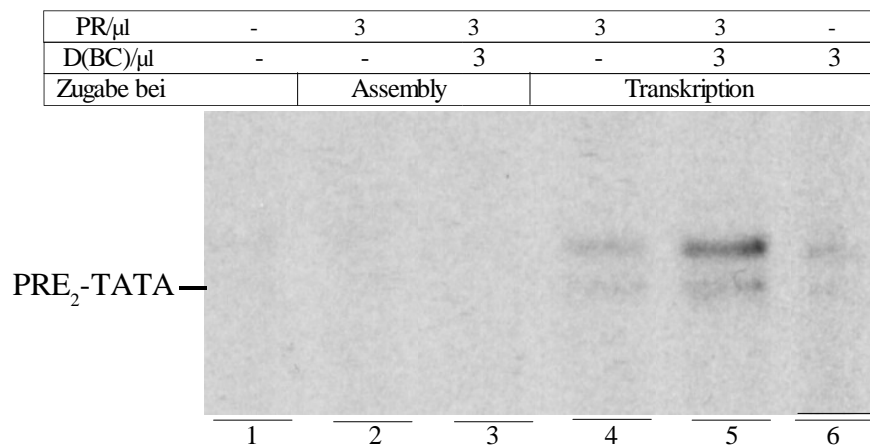


Abb. 10: Chromatintranskription unter Zugabe von rekombinantem PR und COPRA

Zellfreie Transkription mit 10 μ l Rattenleber-Kernextrakt unter Verwendung des in Chromatin verpackten Reporterkonstruktes PRE₂-TATA. Zu der Assemblyreaktion (Spuren 2-3) bzw. zu der Transkriptionsreaktion (Spuren 4-6) wurden der rekombinant erstellte PR bzw. der PR zusammen mit der COPRA haltigen Fraktion D(BC) zugegeben. Die Position der korrekt initiierten Transkripte des Reporterkonstruktes sind angegeben.

Weiterhin fällt auf, daß in der Chromatintranskription zusätzlich zu dem eigentlichen Transkript ein weiteres leicht größeres Transkript detektierbar ist (Abb. 10 Spur 5, Abb. 8C Spur 5). Auch in Transkriptionsreaktionen auf „nackter“ DNA ist dieses Phänomen, jedoch wesentlich schwächer, zu erkennen (Abb. 7B und C). Erklärbar ist dies durch eine Transkriptionsinitiation kurz vor dem eigentlichen Transkriptionsstartpunkt („read-through“). Es entstehen so Transkripte, die nicht nur die G-freie Kassette des Reporterkonstruktes umfassen, sondern auch einige zusätzliche Nukleotide, die von der nach der Transkription verwendeten T1-RNase nicht vollständig herausgeschnitten werden. Der größere Anteil an „read-through“ bei der Chromatintranskription im Vergleich zu der Transkription auf nackter DNA ist möglicherweise durch eine hohe GTP Konzentration des bei dem Chromatinassembly verwendeten *Xenopus* Extraktes zu erklären.

3.7 Die cDNA- und Proteinsequenz von CAP350

Zur Suche nach Kofaktoren gibt es neben dem Einsatz eines rekonstituierten in-vitro Transkriptionssystems noch weitere Ansätze wie z.B. die Verwendung des Hefe-“two-hybrid“ Systems, mit dem interagierende Proteine gefunden werden können.

Um Proteine, die mit dem PR hormonabhängig interagieren und demnach gute Kandidaten zur transkriptionellen Regulation des PR darstellen, zu isolieren, wurde in unserer Arbeitsgruppe eine humane HeLa cDNA Bank durchsucht (Schwerk, 1997). Da potentielle hormonabhängig wirkende Kofaktoren mit der Hormon beladenen Ligandenbindungsdomäne interagieren sollten, wurde als Zielprotein der carboxyterminale Anteil des PR (AS 456 - 933 und AS 631 - 933) verwendet. Es gelang so, zwei cDNA Sequenzen, die agonistabhängig mit dem PR interagieren, zu isolieren. Einer der beiden gefundenen Klone umfaßte 1823 bp eines internen Bereiches des inzwischen von uns als CAP350 (centrosomal associated protein of 350 kD) bezeichneten Gens, welches einen offenen Leserahmen von 599 As kodierte.

In Northernblot Analysen konnte Dr. Schwerk die stärkste CAP350 Expression im Hoden nachweisen, wobei er ein Haupttranskript von ca. 10 kb und Transkripte von 9 kb bzw. 7 kb identifizieren konnte. In weiteren Geweben konnte er nur ein schwaches, ca. 10 kb Transkript (Milz, Thymus, Prostata, Eierstock, Dünndarm, Dickdarm, Leukozyten, Gehirn, Gebärmutter, Skelettmuskel, Bauchspeicheldrüse) nachweisen, während in Lunge, Leber und Niere kein Transkript nachgewiesen werden konnte.

Dr. Michels (Dissertation, 1999) gelang es, die Sequenz der cDNA sowohl in 5'- als auch in 3'-Richtung auf insgesamt 5947 bp zu verlängern. Er konnte so den 5'-untranslatierten Bereich und das Start Codon von CAP350 kartieren. Auf Grund der Verwendung eines einzelnen Klons im 3'-Bereich der von ihm analysierten Sequenz und auf Grund von Schwierigkeiten bei der Sequenzierung identifizierte er ein Stop-Codon in der eigentlich noch kodierenden Sequenz, so daß das von ihm postulierte Protein nur 1746 Aminosäuren umfaßte.

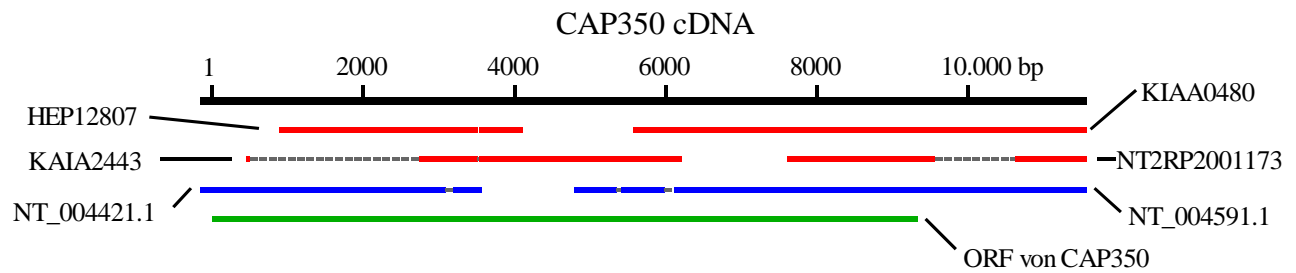


Abb. 11: Schematische Darstellung der Sequenzhomologien zwischen den mRNA-, cDNA- und genomischen-Datenbankklonen und der Vollängen CAP350 cDNA Sequenz

Die CAP350 cDNA Sequenz ist mit Größenstandards oben schematisch dargestellt. Die Numerierung der Nukleotidsequenz beginnt mit dem Adenin des Startcodons, der 5'-untranslatierte Bereich wurde darauf bezogen mit negativen Zahlenwerten versehen. Die Bereiche der Sequenzhomologien >95 % der cDNA bzw. mRNA (beide rot) und genomischen (blau) Datenbankklone zu der CAP350 cDNA Sequenz sind unterhalb dargestellt und die jeweiligen Sequenznamen angegeben. Interne nicht in den Datenbankklonen enthaltene Sequenzen sind grauschraffiert. Der „open reading frame“ (ORF) von CAP350 ist in grün dargestellt.

Durch Datenbankvergleiche fand Dr. Michels neben diversen Homologien zu EST-Sequenzen aus Mensch, Ratte und Maus auch in dem von ihm als 3'-untranslatiert eingeschätzten Bereich eine perfekte Homologie zu dem kodierenden Teil eines als KIAA0480 bezeichneten Gens auf dem Chromosomen 1. Durch Sequenzierungsfehler ging Dr. Michels davon aus, daß der 3'-Bereich des von ihm identifizierten CAP350 Anteils und die KIAA0480 Sequenz durch mehrere Stop-Codons voneinander getrennt seien. Neuere Datenbankvergleiche zeigen jedoch durch einen putativen überlappenden cDNA Klon (KAIA2443), daß die kodierende Sequenz von CAP350 nicht vor der KIAA0480 Sequenz stoppt, sondern daß der „open reading frame“ (ORF) von CAP350 in den KIAA0480 Bereich hineinreicht (Abb. 11 und Tabelle 1). Zusätzlich zu den cDNA Datenbankvergleichen wurde der Übergang der CAP350 Sequenz zu der KIAA0480 Sequenz analysiert. Dazu wurden RT-PCR Analysen auf RNA von verschiedenen humanen, bzw. Ratten Zellen, durchgeführt. Die bei der PCR Reaktion verwendeten Primer hybridisieren in der humanen Sequenz an der 3'-Position 4213 im von Dr. Michels isolierten CAP350 Bereich (Primer1, vergl. Anhang 1) und im 5'-Bereich in der KIAA0480 Sequenz (humane CAP350 Position 5714 (Primer 2), vergleiche Anhang 1). Die RT-PCR ergibt ein DNA Produkt der erwarteten Größe von 1,5 kb (Abb. 21). Eine Sequenzierung dieses PCR Produktes zeigte, daß es sich tatsächlich um den Übergang der von Dr. Michels isolierten CAP350 Sequenz in den KIAA0480 Bereich handelt. Die cDNA von CAP350 ist demnach vermutlich 11740 bp lang und kodiert für 3117 Aminosäuren (Anhang 1).

Ein Vergleich von CAP350 mit dem cDNA Klon KAIA2443 zeigt nicht nur durchgehende Sequenzübereinstimmungen in den überlappenden Bereichen, sondern auch interne CAP350 Sequenzbereiche, in denen keine Homologien zu erkennen sind, was vermutlich durch „splice“-Varianten zu erklären ist (Abb. 11 und Tabelle 1).

mRNA/cDNA	Gewebe	Identität	% Homologie	Von Position	Bis Position
KIAA0480	Gehirn	5963/6006	99	5568	11573
HEP12807	Leber	2606/2623	99	894	3516
HEP12807	Leber	568/568	100	3544	4111
KAIA2443	Darmschleimhaut	44/44	100	465	508
KAIA2443	Darmschleimhaut	770/779	98	2738	3518
KAIA2443	Darmschleimhaut	2666/2675	99	3544	6218
NT2RP2001173	Hoden	1749/1780	98	7609	9555
NT2RP2001173	Hoden	934/944	98	10630	11573
Humane genomische Klone		Identität	% Homologie	Von Position	Bis Position
NT-004421.1		155/156	99	-167	-12
NT-004421.1		89/89	100	-16	73
NT-004421.1		49/49	100	72	120
NT-004421.1		115/115	100	121	235
NT-004421.1		162/163	99	234	396
NT-004421.1		629/630	99	393	1022
NT-004421.1		115/116	99	1017	1125
NT-004421.1		123/124	99	1125	1248
NT-004421.1		148/150	98	1245	1394
NT-004421.1		661/661	100	1393	2053
NT-004421.1		124/124	100	2051	2174
NT-004421.1		898/900	99	2173	3072
Kein Eintrag				3072	3175
NT-004421.1		62/62	100	3175	3236
NT-004421.1		153/153	100	3234	3386
NT-004421.1		165/165	100	3387	3551
Kein Eintrag				3551	4791
NT_004591.1		200/200	100	4791	4990
NT_004591.1		187/187	100	4988	5174
NT_004591.1		89/89	100	5205	5263
NT_004591.1		85/89	95	5261	5349
Kein Eintrag				5349	5409
NT_004591.1		161/161	100	5409	5569
NT_004591.1		200/200	100	5566	5767

Humane genomische Klone	Identität	% Homologie	Von Position	Bis Position
NT_004591.1	214/214	100	5766	5979
Kein Eintrag			5979	6121
NT_004591.1	165/165	100	6121	6285
NT_004591.1	142/142	100	6284	6425
NT_004591.1	85/86	98	6423	6508
NT_004591.1	2005/2005	100	6508	8512
NT_004591.1	410/410	100	8511	8920
NT_004591.1	149/149	100	8918	9066
NT_004591.1	127/127	100	9065	9191
NT_004591.1	2383/2385	99	9189	11573

Tab. 1: Nukleotidsequenzhomologien zu CAP350

Angegeben sind die cDNA und die chromosomalen Datenbanksequenzen mit signifikanter Homologie, die Länge der sequenzierten Abschnitte, sowie die Übereinstimmung der überlappenden Bereiche mit dem Grad der Sequenz-Identität. Die Position der Überlappungen bezieht sich auf die in Anhang 1 gezeigten CAP350 Sequenz, bei der die Numerierung der Nukleotidsequenz mit dem Adenin des Startcodons beginnt und der 5'-untranslatierte Bereich mit negativen Zahlenwerten versehen wurde. Die überlappenden Bereiche der genomischen DNA Sequenz sind 5'-3'-sortiert. CAP350 cDNA-Bereiche, die in den genomischen Klonen fehlen, sind als „Kein Eintrag“ markiert.

Im Laufe des „human genome projects“ ist inzwischen ein großer Teil des Chromosoms 1, auf dem die Sequenz von CAP350 liegt, sequenziert. Ein Vergleich der cDNA Sequenz mit diesen genomischen DNA Sequenzen zeigt, daß ein Großteil der Exons von CAP350 inzwischen sequenziert worden sind.

Neben einigen kleineren auf genomischer Ebene bisher nicht sequenzierten Bereichen verbleibt nur noch ein großer nicht sequenzierter CAP350 Sequenzanteil im Übergangsbereich zu der KIAA0480 Sequenz (3551-4790 bp, vergleiche Tab. 1 und Abb. 11). Durch einen Vergleich der genomischen DNA Sequenz mit der cDNA Sequenz von CAP350 konnten so bisher 30 Exons identifiziert werden (Tab. 1, Abb. 29).

Die Aminosäuresequenz von CAP350 zeigt analysiert mit der PROSCAN Software (<http://bmw.ibcp.fr/cgi-bin/pattern>), bzw. mit der PSORTII Software (<http://psort.nibb.ac.jp/cgi-bin/runpsort.pl>), einige auffällige Proteinmotive. So findet man neben sieben Kernlokalisierungssignalen (NLS) und neben sieben „Coiled-coil“-Domänen auch eine CAP-Gly Domäne in CAP350. Die genaue Lokalisation dieser Domänen wird in Tabelle 2 und in Abb. 19A schematisch dargestellt.

Strukturmotiv	Von Position	Bis Position
CAP-Gly Domäne	2517	2548
„Coiled-coil“ Domäne	599	644
„Coiled-coil“ Domäne	821	849
„Coiled-coil“ Domäne	1378	1413
„Coiled-coil“ Domäne	1738	1787
„Coiled-coil“ Domäne	1865	1898
„Coiled-coil“ Domäne	2054	2098
„Coiled-coil“ Domäne	2718	2752
„Bipartite“ Kernlokalisierungssignal	65	82
„Bipartite“ Kernlokalisierungssignal	274	291
Kernlokalisierungssignal	568	574
Kernlokalisierungssignal	583	590
Kernlokalisierungssignal	1737	1744
„Bipartite“ Kernlokalisierungssignal	2062	2080
„Bipartite“ Kernlokalisierungssignal	2254	2270

Tab. 2: Struktur motive der CAP350 Aminosäuresequenz

Angegeben sind die vorhergesagten Struktur motive des CAP350 Proteins. Die angegebenen Positionen beziehen sich auf die in Anhang 1 angegebene Aminosäuresequenz. Die „Coiled-coil“-Domänen und die NLS Signale wurden mit PSORT II berechnet, wobei der Beginn und das Ende der „Coiled-coil“-Domänen bei Werten über bzw. unter 97 %-iger Wahrscheinlichkeit in die Tabelle eingetragen wurden. Die Bestimmung der CAP-Gly Domäne wurde mit PROSCAN durchgeführt.

Wie von Riehemann et al., 1993 gezeigt werden konnte, enthalten einige Cytoskelett-assoziierte Proteine, wie z.B. Restin, CLIP-170, Glued und Dynactin, eine konservierte, glycinreiche Domäne, die als CAP-Gly Domänen (cytoskeleton-associated protein glycine rich) bezeichnet wird. Da CAP350 ebenfalls eine CAP-Gly Domäne enthält, könnte dies auf eine Interaktion mit dem Cytoskelett deuten.

Die vier unabhängigen bipartiden Kernlokalisierungssignale und die drei weiteren Kernlokalisierungssignale (nuclear localisation signals, NLS) von CAP350 könnten auf eine Lokalisation im Zellkern hindeuten.

Die zahlreichen „Coiled-coil“ Strukturen, die häufig in centrosomalen Proteinen wie z.B. Pericentrin (Dicthenberg et al., 1998; Doxsey et al., 1994) oder aber auch in Golgi Proteinen wie z.B. golgin245/p230 oder golgin-97 (Munro and Nichols, 1999) zu finden sind, deuten auf eine centrosomale Lokalisation oder auf eine Lokalisation am Golgi-Apparat hin.

3.8 Der Nachweis von CAP350 auf Proteinebene

3.8.1 Die Bestimmung der zellulären Lokalisation von CAP350 durch Immunfluoreszenzmikroskopie

Um die bislang vollständig unbekannte Funktion von CAP350 einzugrenzen, wurde zunächst die zelluläre Lokalisation des CAP350 Proteins mittels Immunfluoreszenzanalysen bestimmt.

Dazu wurden 3 Antikörper in Kaninchen gegen das CAP350 Protein erstellt. Zur Immunisierung der Kaninchen wurden in E.coli rekombinant erstellte His- bzw. GST-Tag Fusionsproteine, die unterschiedliche Bereiche des CAP350 Proteins umfaßten, verwendet (L. Klein-Hitpass, unveröffentlicht). So erkennen der Ep460 Antikörper die Aminosäuren 972-1249 und der Ep76 Antikörper die Aminosäuren 1873-2055 des humanen CAP350 Proteins und der Ep74 Antikörper die Aminosäuren 1426-1580 des Ratten-CAP350 Proteins (Abb. 12F). Diese polyklonalen Antikörper wurden anschließend gegen das entsprechende Fusionsprotein affinitätsgereinigt. Um auszuschließen, daß der Anteil der polyklonalen GST erkennenden Antikörper der mit GST-Fusionsproteinen immunisierten Kaninchen das Immunfluoreszenzergebnis verfälscht, wurden die Antikörper zusätzlich mittels Affinitätsreinigung gegen das bakterielle GST Protein an GST erkennenden Antikörpern abgereichert.

Bei der Immunfluoreszenzanalyse auf humanen HEK293 Zellen kann mit den beiden gegen das humane CAP350 gerichteten, affinitätsgereinigten Antikörpern ein Signal bzw. manchmal zwei sehr nah beieinander liegende Signale am oder auf dem Zellkern detektiert werden (Abb. 12A und B). Der gegen das Ratten CAP350 erstellte Ep74 Antikörper zeigt auf HEK293 Zellen eine vergleichbare Färbung, wie die gegen das humane CAP350 gerichteten Antikörper. Ep74 erkennt somit auch das humane CAP350 Protein (Abb. 12C), zeigt aber im Vergleich zu den gegen das humane CAP350 erstellten Antikörpern mehr Hintergrundfärbung, was möglicherweise auf unspezifische Bindungen hindeutet. Da alle drei CAP350 Antikörper vergleichbare Färbungen zeigen und die IgG-Fractionen aus Kontrollseren der Kaninchen keine vergleichbaren Signale zeigen (Abb. 12D und E), kann die Färbung als spezifisch angesehen werden.

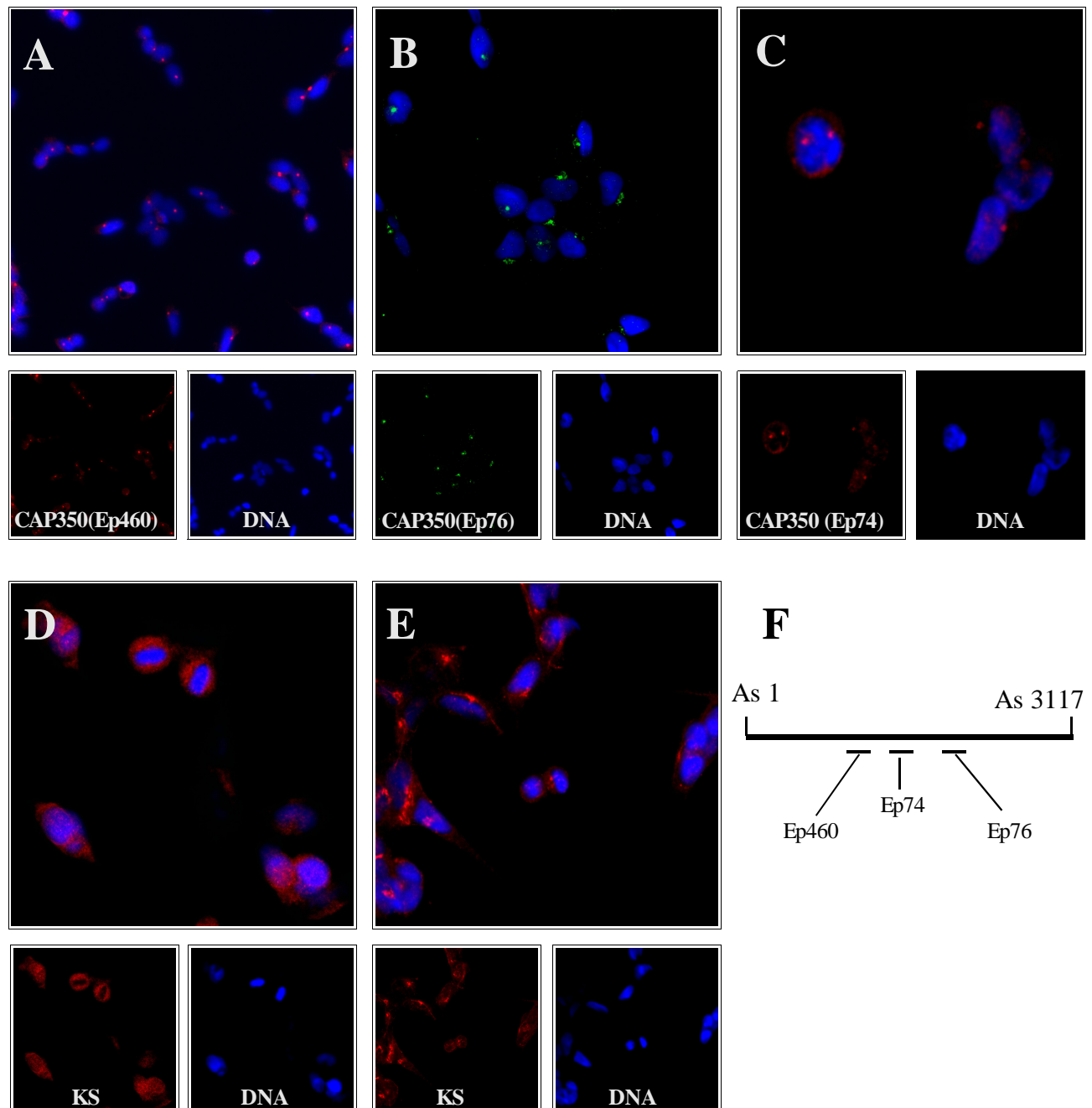


Abb. 12: Immunfluoreszenzanalysen mit CAP350 Antikörpern auf HEK293 Zellen

(A-E) Immunfluoreszenzanalyse auf HEK293 Zellen. In A-C wurde jeweils CAP350, das in A durch Ep460 mit Cy3 (rot), in B durch Ep76 mit Alexa488 (grün) und in C durch Ep74 mit Cy3 (rot) gekoppelten 2. Antikörpern markiert wurde, nachgewiesen. Bei D wurde Kontrollserum des Kaninchens #460, bei E Kontrollserum des Kaninchens #76 jeweils mit Cy3 (rot) gekoppelten 2. Antikörpern nachgewiesen. Die Zellkerne sind mit Hoechst 33342 gefärbt (blau). In den verkleinerten Abbildungen wird der rote und der blaue bzw. in B der grüne und blaue Immunfluoreszenz-Kanal einzeln dargestellt.

(F) Schematische Darstellung des CAP350 Proteins. Angegeben sind die Anteile des CAP350 Proteins, die mit den affinitätsgereinigten Antikörpern Ep460, Ep74 und Ep76 interagieren. Der Ep460 Antikörper ist gegen die Aminosäuren 972-1249 und der Ep76 gegen die Aminosäuren 1873-2055 des humanen CAP350 Proteins gerichtet. Der Ep74 ist gegen die Aminosäuren 1426-1580 des Rattenproteins, bezogen auf die vergleichbare humane CAP350 Proteinsequenz, gerichtet.

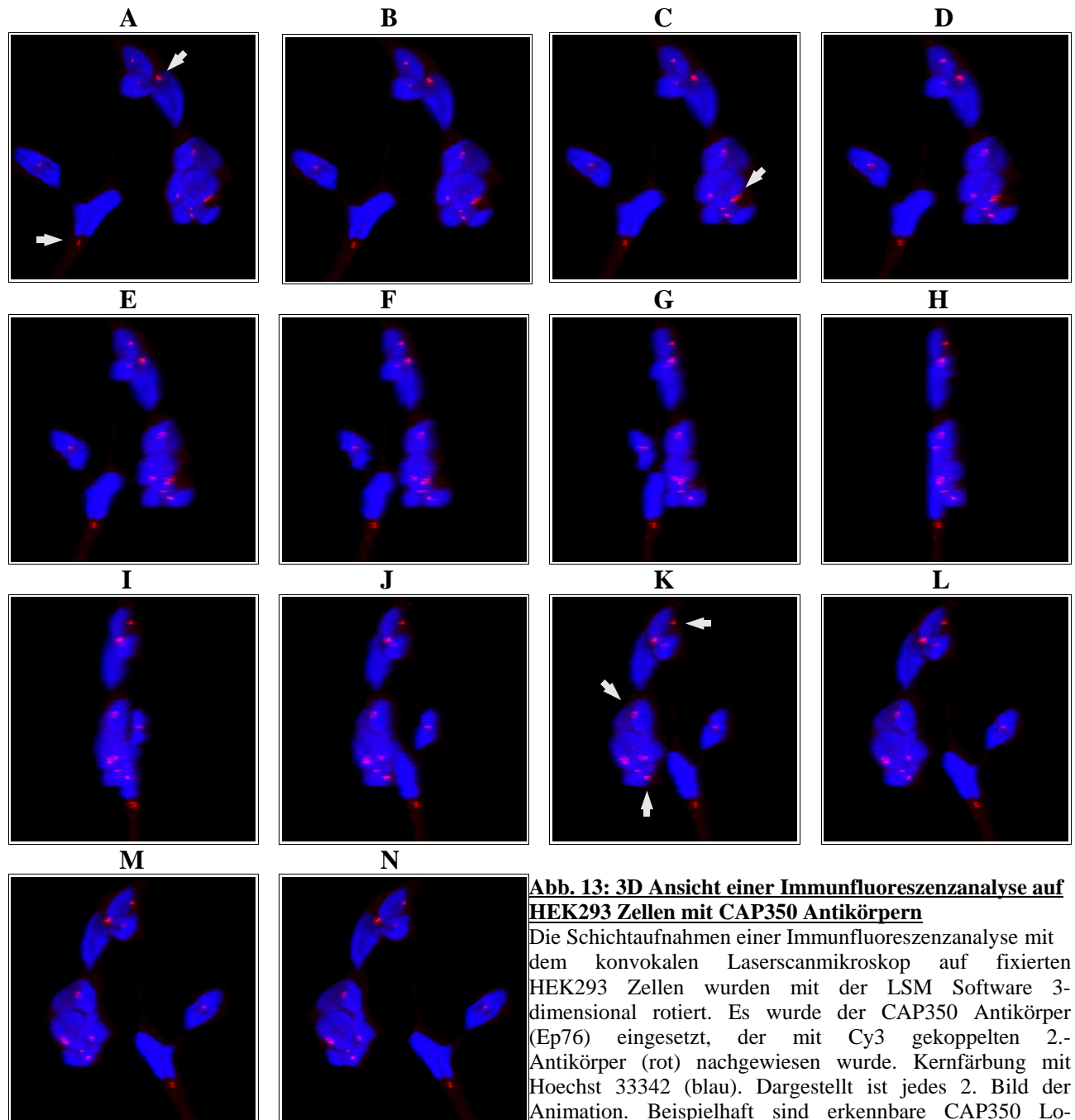


Abb. 13: 3D Ansicht einer Immunfluoreszenzanalyse auf HEK293 Zellen mit CAP350 Antikörpern

Die Schichtaufnahmen einer Immunfluoreszenzanalyse mit dem konvokalen Laserscannmikroskop auf fixierten HEK293 Zellen wurden mit der LSM Software 3-dimensional rotiert. Es wurde der CAP350 Antikörper (Ep76) eingesetzt, der mit Cy3 gekoppelten 2.-Antikörper (rot) nachgewiesen wurde. Kernfärbung mit Hoechst 33342 (blau). Dargestellt ist jedes 2. Bild der Animation. Beispielhaft sind erkennbare CAP350 Lokalisationen außerhalb der Zellkerns durch Pfeile markiert.

Um zu überprüfen, ob die von den CAP350 Antikörpern gezeigten Signale tatsächlich am und nicht im Zellkern liegen, wurden Schichtaufnahmen mit einem konfokalen Laserscannmikroskop (LSM) in HEK293 Zellen erstellt und diese mit Hilfe der LSM-Software dreidimensional im Raum animiert. Abbildung 13 zeigt jedes 2. Bild der Animation.

In der Animation ist zu erkennen, daß die Antikörpersignale außerhalb, aber in direkter Nachbarschaft des Zellkerns liegen. Häufig liegt das erkannte CAP350 Protein direkt in Vertiefungen auf der Kernmembran.

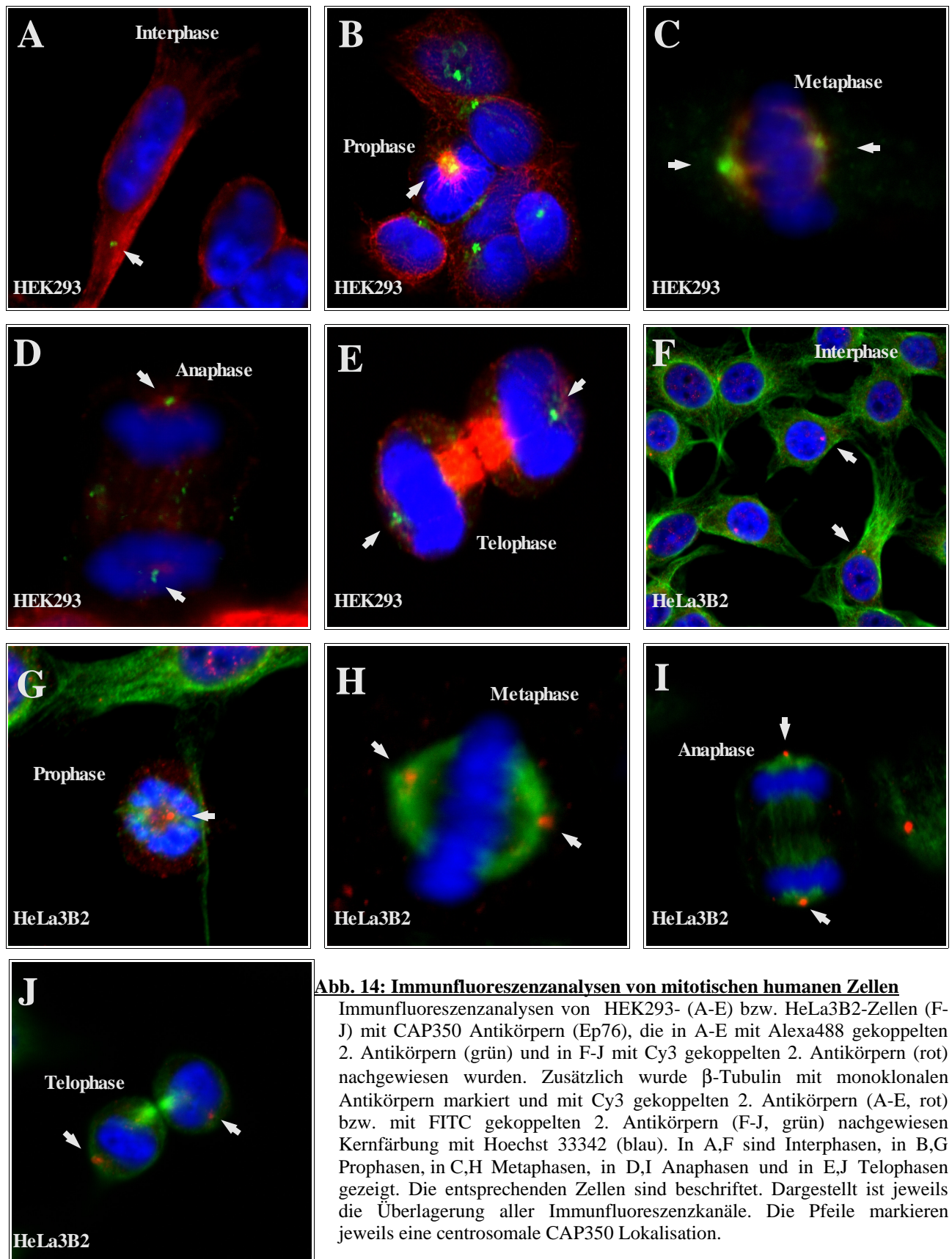


Abb. 14: Immunfluoreszenzanalysen von mitotischen humanen Zellen

Immunfluoreszenzanalysen von HEK293- (A-E) bzw. HeLa3B2-Zellen (F-J) mit CAP350 Antikörpern (Ep76), die in A-E mit Alexa488 gekoppelten 2. Antikörpern (grün) und in F-J mit Cy3 gekoppelten 2. Antikörpern (rot) nachgewiesen wurden. Zusätzlich wurde β -Tubulin mit monoklonalen Antikörpern markiert und mit Cy3 gekoppelten 2. Antikörpern (A-E, rot) bzw. mit FITC gekoppelten 2. Antikörpern (F-J, grün) nachgewiesen. Kernfärbung mit Hoechst 33342 (blau). In A,F sind Interphasen, in B,G Prophasen, in C,H Metaphasen, in D,I Anaphasen und in E,J Telophasen gezeigt. Die entsprechenden Zellen sind beschriftet. Dargestellt ist jeweils die Überlagerung aller Immunfluoreszenzkanäle. Die Pfeile markieren jeweils eine centrosomale CAP350 Lokalisation.

Um die zelluläre Lokalisation von CAP350 während des Zellzyklusses zu analysieren, wurde die Lokalisation von CAP350 in verschiedenen Mitosestadien in HeLa3B2, ein stabil die B-Form des PR exprimierender HeLa-Zellklon (Kahmann et al., 1998), und in HEK293 Zellen untersucht. Hierzu wurden neben der Färbung des Zellkerns eine Doppelfärbung mit Ep76 und mit einem Maus-monoklonalen Antikörper gegen β -Tubulin, welcher die während der Zellteilung von den Mitosespindeln ausgehenden Mikrotubuli färbt, durchgeführt. Die mitotischen Zellen wurden mit Hilfe des konfokalen Laserscanmikroskops identifiziert und in der Immunfluoreszenz analysiert (Abb. 14 A-J).

In HeLa3B2 und HEK293 Zellen erkennt man das stärkste Antikörpersignal während der Mitose grundsätzlich an dem Ausgangspunkt der mitotischen Mikrotubuli, an denen die Centrosomen liegen (Abb. 14B-E, G-J).

In der Interphase zeigt der CAP350 Antikörper sowohl in HEK293 (Abb. 14A), wie schon in den Abb. 12 und 13 gezeigt, als auch in HeLa3B2 Zellen (Abb. 14F) eine punktförmige Anlagerung von CAP350 häufig in der Nähe des Zellkerns, was eine centrosomale Lokalisation vermuten läßt. Da diese Lokalisation sowohl in HEK293 Zellen wie auch HeLa3B2 Zellen identisch ist, ist die CAP350 Lokalisation nicht Zelltyp abhängig.

In der Prophase, in der sich die Membran des Zellkerns auflöst und die Chromosomen kondensieren, erkennt man sowohl bei HeLa3B2 als auch bei HEK293 Zellen zwei nah beieinanderliegende starke Antikörpersignale, von denen die Mikrotubuli sternförmig ausgehen (Abb. 14B,G). In der Metaphase, in der sich die Chromosomen entlang der äquatorialen Ebene aufreihen, liegen die Antikörpersignale ebenfalls wie in der Anaphase, in der die Chromatiden getrennt voneinander vorliegen, hauptsächlich an den Spindelpolen (Abb. 14C,D,H,I). Schwächere Signale sind auch in der Nähe der größten Mikrotubulkonzentrationen auszumachen. Auch in der Telophase, in der die Cytokinese stattfindet, liegt das Antikörpersignal an den jeweiligen Spindelpolen (Abb. 14E,J).

Die Lokalisation während der Mitose zeigt, daß es sich bei dem CAP350 Protein hauptsächlich um ein centrosomal assoziiertes Protein handelt, was auch im geringen Maße mit den Mikrotubuli kolokalisiert.

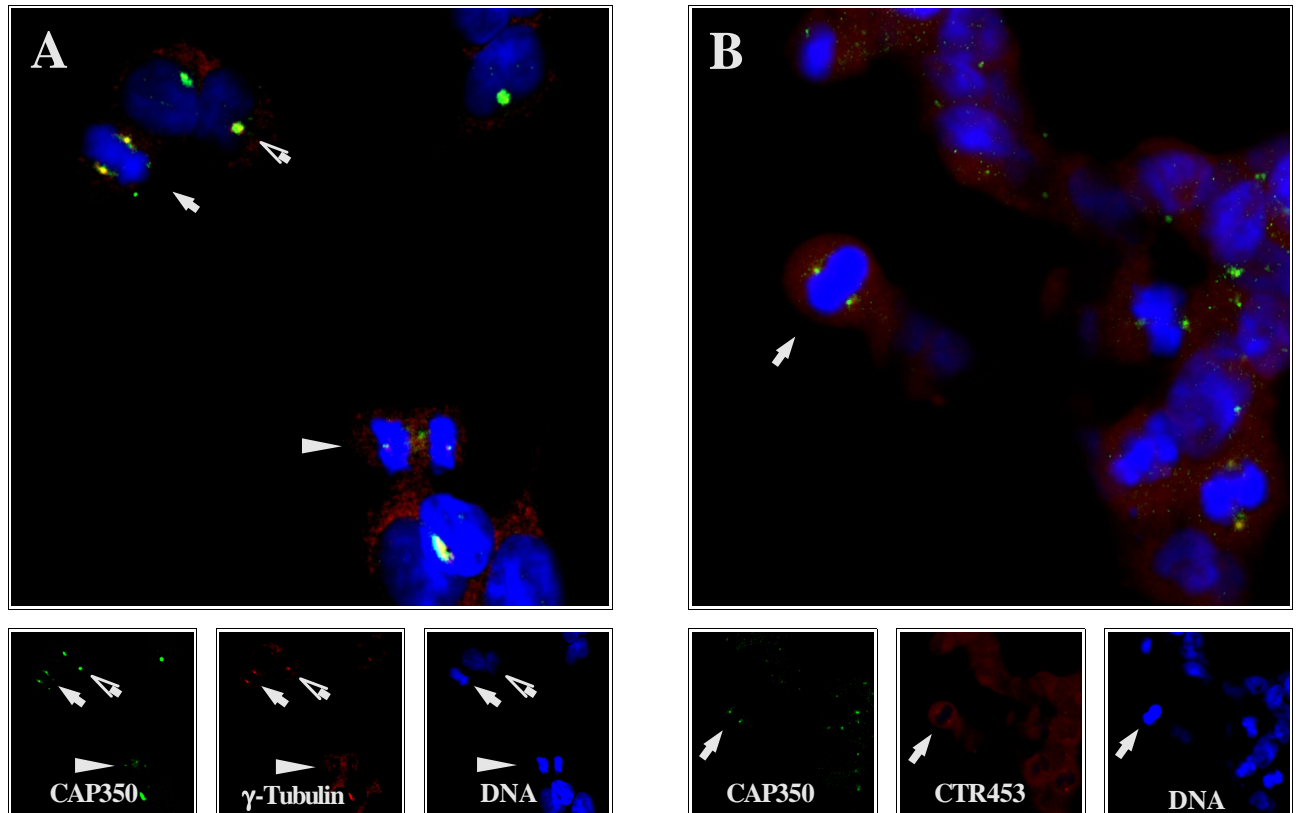


Abb. 15: Kolokalisationsanalysen von CAP350 mit γ -Tubulin bzw. CTR453 Antikörpern

Kolokalisationsimmunfluoreszenzanalysen in HEK293 Zellen mit affinitätsgereinigten CAP350 Antikörpern (Ep76), nachgewiesen mit Alexa488 gekoppelten 2. Antikörpern (grün) und in (A) mit γ -Tubulin Antikörpern bzw. in (B) mit CTR453 Antikörpern nachgewiesen mit Cy3 gekoppelten 2. Antikörpern (rot). Kernfärbung mit Hoechst 33342. In den verkleinerten Abbildungen wird der grüne, rote bzw. blaue Kanal einzeln dargestellt. Die offenen Pfeile zeigen in (A) auf 2 Interphasen, die geschlossenen Pfeile auf eine Metaphase und die Pfeilspitzen auf eine Anaphase. In (B) zeigen die Pfeile auf eine Metaphase.

Durch Kolokalisationsexperimente in HEK293 Zellen mit CAP350 Antikörpern und Antikörpern gegen andere bekannte centrosomale Proteine sollte bestätigt werden, daß CAP350 ebenfalls centrosomal vorliegt. Verwendet wurde neben dem affinitätsgereinigten CAP350 Antikörper (Ep76) Antikörper gegen centrosomales γ -Tubulin oder CTR453 Antikörper, die ein ca. 350 kD großes Protein in der pericentriolaren Masse des Centrosom erkennen (A.M. Tassin, Curie Institut, Paris).

In der γ -Tubulin - CAP350 Doppelfärbung in Abb. 15A erkennt man, daß sich mehrere Zellen in der Interphase und jeweils eine Zelle in der Meta- bzw. Anaphase befinden. Die Zellen in der Interphase zeigen eindeutig Kolokalisation der beiden Antikörper, wobei das Signal für CAP350 großflächiger und stärker ist als das für γ -Tubulin. Da auch eine geringe, diffuse cytoplasmatische Färbung erkennbar ist, scheint CAP350 ebenfalls in geringer Konzentration nicht centrosomal gebunden im Cytoplasma vorzuliegen. Die beiden mitotischen Zellen zeigen ebenfalls Kolokalisation am Centrosom, wobei man bei der Zelle in der Anaphase durch den Nachweis von CAP350 sogar die einzelnen Centriolen erkennen kann (Abb. 15A). CAP350 scheint in der

Metaphase nicht nur an den Centrosomen selber gebunden zu sein, sondern möglicherweise auch am Ansatz der Mikrotubuli der mitotischen Zelle, da nicht nur das Centrosom selber, sondern auch eine netzwerkartige Färbung in Richtung der äquatorial liegenden DNA schwach am Ansatz der Centrosomen zu erkennen ist. Auch bei der Zelle in der Anaphase erkennt man im Bereich der größten Mikrotubulikonzentration zwischen den getrennten Chromatiden eine schwache CAP350 Färbung.

Der CTR453 Antikörper zeigt eine wesentlich schwächere centrosomale, aber eine wesentlich stärkere cytoplasmatische Färbung im Vergleich zu dem γ -Tubulin Antikörper in HEK293 Zellen (Abb. 15B). Zudem ist die centrosomale Färbung des CTR453 Antikörpers fast ausschließlich nur bei mitotischen Zellen zu erkennen, da Interphasenzellen ein fast gleichmäßiges cytoplasmatisches aber nur ein sehr schwaches centrosomales Signal zeigen. In HEK293 Zellen ist bei der Doppelfärbung mit CTR453 und Ep76 in Abb. 15B eine Kolokalisation bei den mitotischen Zellen trotzdem klar auszumachen.

Zusätzlich zu der Lokalisation von CAP350 am Centrosom ist in den mitotischen Zellen eine schwache Kolokalisation zwischen den CAP350 Antikörpersignalen und den β -Tubulin Signalen sowohl in HEK293 Zellen als auch in HeLa 3B2 Zellen an den mitotischen Mikrotubuli auszumachen (Abb. 14B,C,D,H,I).

CAP350 bindet demnach während der Zellteilung hauptsächlich an das Centrosom, aber auch direkt oder indirekt an die mitotischen Mikrotubuli.

3.8.2 Nachweise von CAP350 im Westernblot

Zur Bestimmung der Proteingröße und zur Detektion möglicher Isoformen des CAP350 Proteins wurde eine Westernblotanalyse mit HEK293 Extrakt und dem epitopgereinigten CAP350 Antikörper Ep76 durchgeführt (Abb. 16A). Als Größenstandard und zur Überprüfung der Antikörperspezifität dienten hierbei Extrakte von mit CAP350 Deletionsmutanten bzw. mit Vollängen CAP350 transfizierten HEK293 Zellen (Spuren 1-3). In den transfizierten Zellen ist jeweils das entsprechende Protein gut nachzuweisen. Auffallend ist hier, daß der Abbau der C-terminal deletierten Mutante CAP350(As 1-1928) (Spur 2) im Vergleich zu der N-terminal deletierten Mutante CAP350(As 1928-3117) (Spur 1) und dem Vollängen CAP350 (Spur 3) erheblich ist. Ein Größenunterschied zwischen dem Vollängenprotein und der CAP350(As 1928-3117) Deletionsmutante ist auf Grund der Größe der beiden Proteine auf diesem 7 % SDS-Polyacrylamidgel nicht mehr auszumachen. In Spur 4 erkennt man in der erwarteten Größe schwach

den immunologischen Nachweis des endogenen CAP350 Proteins in HEK293 Zellen.

In Zusammenarbeit mit Anne-Marie Tassin vom Curie Institut in Paris wurden Westernblotanalysen mit den Triton löslichen bzw. unlöslichen Extraktbestandteilen von humanen KE37 Zellen durchgeführt. Zusätzlich wurde eine centrosomale Fraktion präpariert und im Westernblot analysiert (Abb. 16B). In der centrosomalen Fraktion konnte CAP350, als ein Protein, was wesentlich größer als die größte Markerbande ist, nachgewiesen werden (Spur 3), wohingegen in den löslichen und unlöslichen Fraktionen kein CAP350 detektiert werden konnte (Spuren 1, 2). Diese Westernblotanalyse zeigt damit, daß es sich bei CAP350 um ein sehr großes Centrosom-assoziiertes Protein handelt.

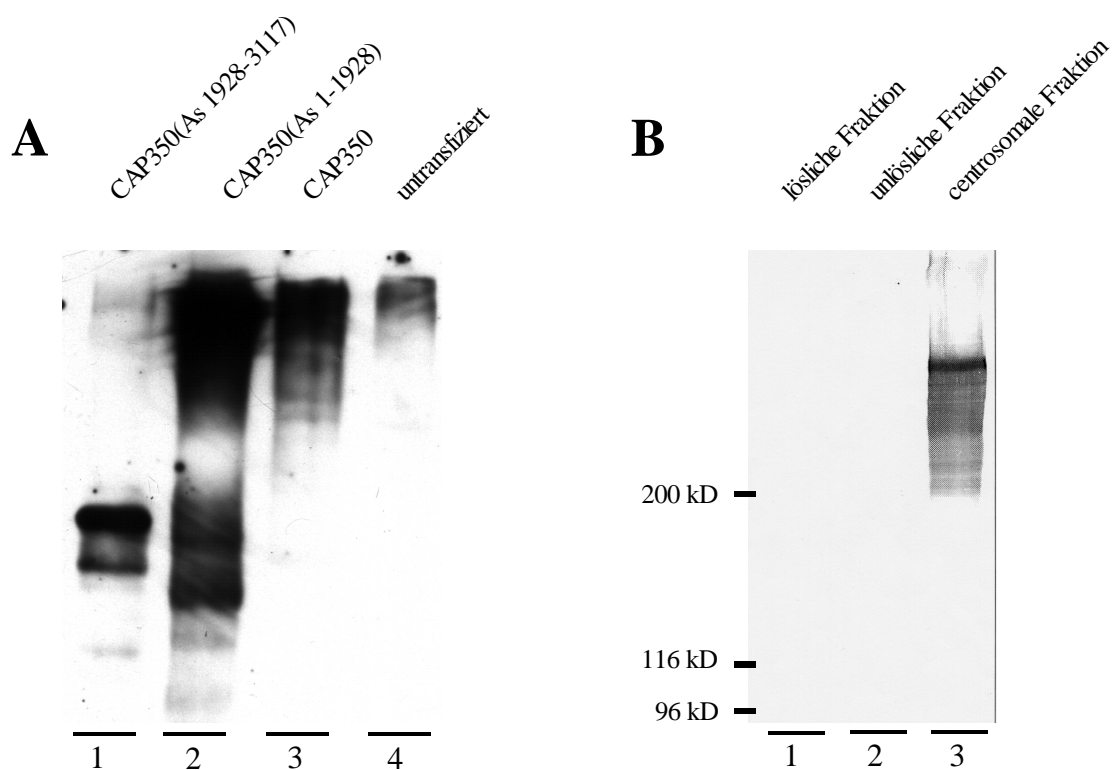


Abb. 16: Nachweis von zellulärem CAP350 in Westernblotanalysen

(A) Westernblotanalyse von HEK293 Ganzzelextrakten, wobei die Zellen von Spur 1 mit CAP350(As 1928-3117), von Spur 2 mit CAP350(As 1-1928) und von Spur 3 mit CAP350 transfiziert waren. Spur 4 zeigt das endogene CAP350. Die Proteine wurden auf einem 7 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der Nachweis der CAP350 Proteine erfolgte mit dem affinitätsgereinigten CAP350 Antikörper Ep76.

(B) Westernblotanalyse von humanen KE37 Zellextrakten. Spur 1 zeigt die Triton X100 löslichen und Spur 2 die Triton X100 unlöslichen Proteinanteile. In Spur 3 ist eine centrosomale Fraktion gezeigt. Die Molekulargewichtsgrößen sind angegeben. Die Proteine wurden auf einem 4 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der Nachweis von CAP350 erfolgte mit dem affinitätsgereinigten CAP350 Antikörper Ep76.

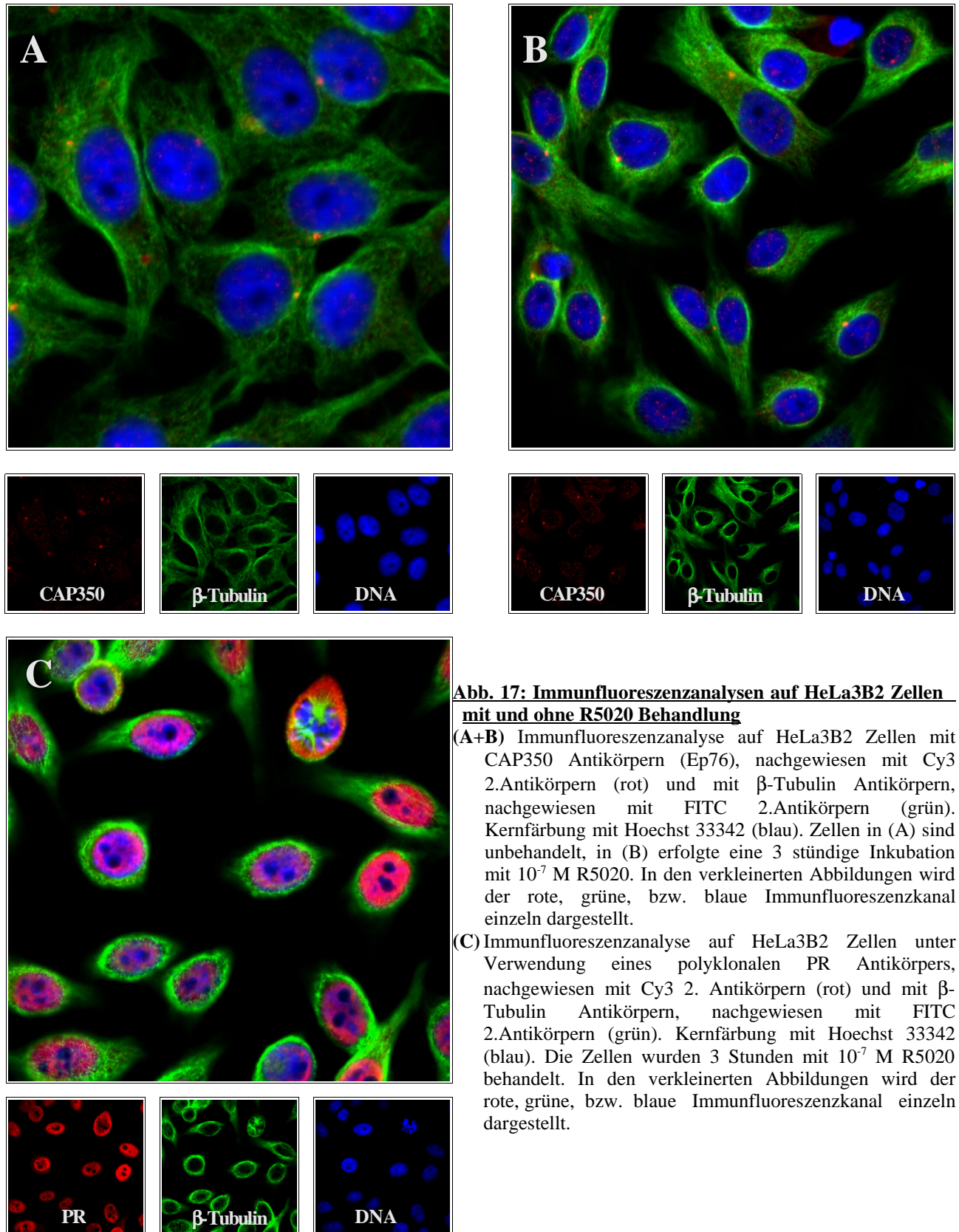


Abb. 17: Immunfluoreszenzanalysen auf HeLa3B2 Zellen mit und ohne R5020 Behandlung

(A+B) Immunfluoreszenzanalyse auf HeLa3B2 Zellen mit CAP350 Antikörpern (Ep76), nachgewiesen mit Cy3 2.Antikörpern (rot) und mit β -Tubulin Antikörpern, nachgewiesen mit FITC 2.Antikörpern (grün). Kernfärbung mit Hoechst 33342 (blau). Zellen in (A) sind unbehandelt, in (B) erfolgte eine 3 stündige Inkubation mit 10^{-7} M R5020. In den verkleinerten Abbildungen wird der rote, grüne, bzw. blaue Immunfluoreszenzkanal einzeln dargestellt.

(C) Immunfluoreszenzanalyse auf HeLa3B2 Zellen unter Verwendung eines polyklonalen PR Antikörpers, nachgewiesen mit Cy3 2. Antikörpern (rot) und mit β -Tubulin Antikörpern, nachgewiesen mit FITC 2.Antikörpern (grün). Kernfärbung mit Hoechst 33342 (blau). Die Zellen wurden 3 Stunden mit 10^{-7} M R5020 behandelt. In den verkleinerten Abbildungen wird der rote, grüne, bzw. blaue Immunfluoreszenzkanal einzeln dargestellt.

3.9 Die Charakterisierung von CAP350

3.9.1 Analyse der PR - CAP350 Interaktion

CAP350 wurde ursprünglich von Dr. Schwerk als hormonabhängiger Interaktionspartner des PR bei Hefe Interaktionsuntersuchungen gefunden. Sofern es auch in-vivo hormonabhängig zu einer Interaktion des PR mit CAP350 kommt, sollte man erwarten, daß nach Inkubation mit dem synthetischen Progestin R5020 CAP350 zumindest teilweise dieselbe zelluläre Lokalisation aufweist wie der PR, der unter diesen Bedingungen nicht centrosomal gebunden, sondern im Zellkern vorliegt (Abb. 17C). Um dies zu überprüfen, wurden in die B-Form des humanen PR stabil exprimierenden HeLa3B2 Zelle Immunfluoreszenzanalysen mit und ohne Zugabe von Hormon durchgeführt. Nachgewiesen wurde jeweils CAP350 und β -Tubulin (Abb. 17A und B).

Sowohl nach der Zugabe von 10^{-7} M des synthetischen Progestins R5020 als auch ohne Hormon liegt CAP350 centrosomal gebunden und nicht wie der PR im Zellkern lokalisiert vor. Ein Einfluß des PR auf die Lokalisation von CAP350 kann somit in Immunfluoreszenzanalysen nicht nachgewiesen werden.

Auch in Immunpräzipitationsanalysen konnte keine spezifische hormonabhängige Interaktion des PR mit CAP350 nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

3.9.2 Der Einfluß der Mikrotubulibindung auf die Lokalisation von CAP350

Wie in den Abb. 14 B,C,D,E,I zu erkennen ist, bindet CAP350 nicht nur an das Centrosom, sondern zeigt zumindest während der Mitose auch mit den Mikrotubuli Koloalisation. Um zu überprüfen, ob ein intaktes Mikrotubuli Netzwerk zur centrosomalen Bindung notwendig ist, wurden HEK293 Zellen 3 h lang mit 5 μ M Nocodazol, einem Inhibitor der Mikrotubuli-Polymerisation, inkubiert, wobei die letzten 30 min der Inkubation auf Eis erfolgten. Durch diese Inkubation sollten die Mikrotubuli vollständig depolymerisiert vorliegen (Piel et al., 2000). Durch eine Doppelfärbung mit dem CAP350 Antikörper Ep76 und dem Maus-monoklonalen β -Tubulin Antikörper konnte so zum einen die Integrität der Mikrotubuli und zum anderen die Lokalisation von CAP350 analysiert werden.

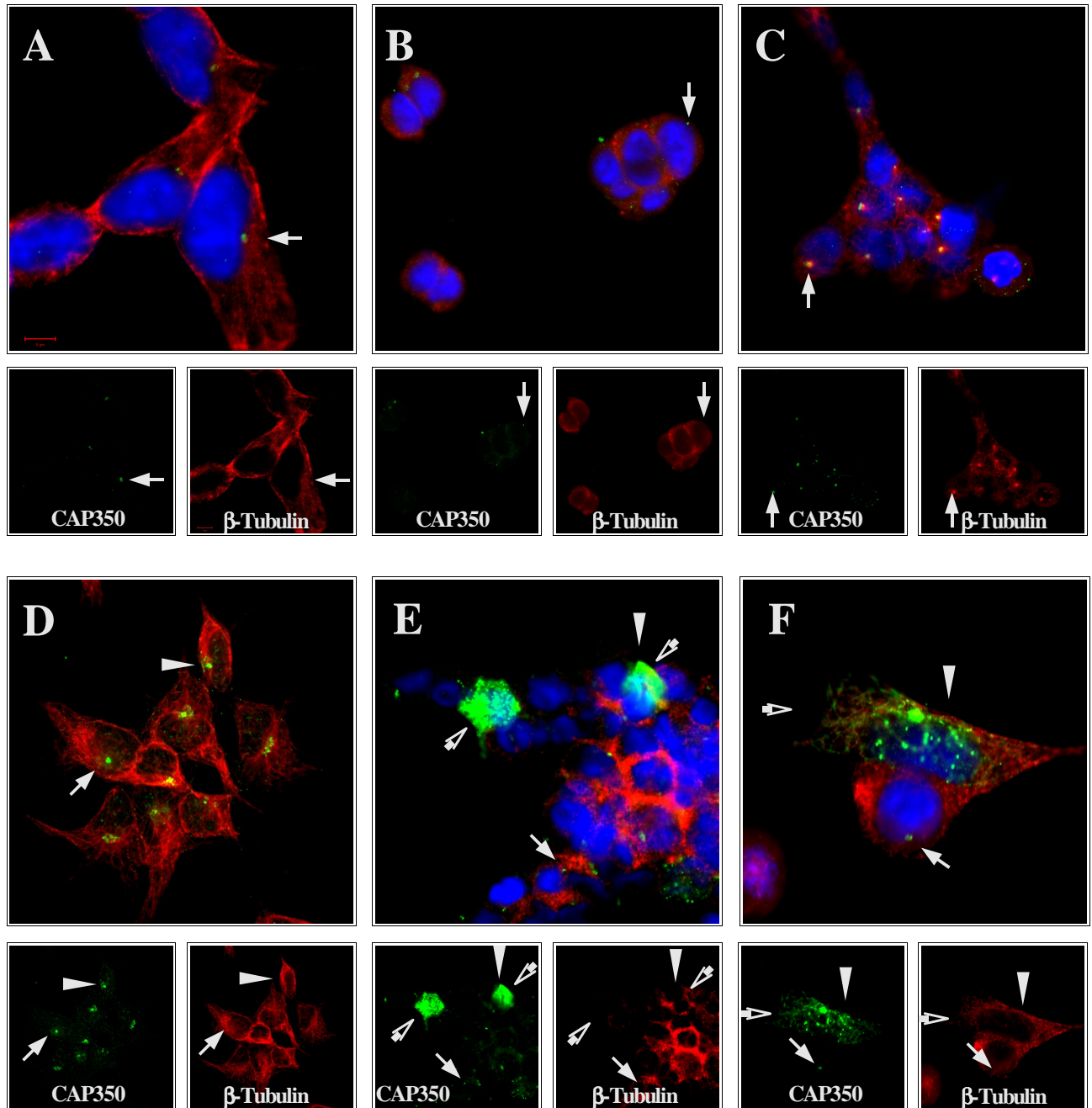


Abb. 18: Immunfluoreszenzanalysen von Nocodazol behandelten HEK293 Zellen

(A-F) Immunfluoreszenzanalysen von HEK293 Zellen mit CAP350 Antikörpern (Ep76) nachgewiesen mit Alexa488 (grün) 2. Antikörpern und mit β-Tubulin Antikörpern, nachgewiesen mit Cy3 2. Antikörpern (rot). Die DNA wurde in A-C und E, F mit Hoechst 33342 (blau) gefärbt. Die Zellen in (A,D) sind unbehandelt, in (B) 3 h mit 5 μM Nocodazol behandelt und in (C) 3 h mit 5 μM Nocodazol behandelt mit anschließender Regeneration (1h). In E+F sind CAP350 überexprimierende Zellen, die zusätzlich über Nacht mit Nocodazol behandelt worden sind, dargestellt. Die Zellen in (F) wurden nach der Nocodazolbehandlung 2 h in Medium regeneriert. In den verkleinerten Abbildungen wird jeweils der grüne bzw. rote Immunfluoreszenz Kanal dargestellt. Centrosomale CAP350 Lokalisationen von nicht überexprimierenden Zellen sind jeweils mit Pfeilen, cytoplasmatische netzwerkartige Lokalisationen von CAP350 mit Pfeilspitzen und CAP350 überexprimierende Zellen in E und F mit offenen Pfeilen markiert.

Ohne Nocodazol-Inkubation erkennt man in HEK293 Zellen ein intaktes, Mikrotubuli-Netzwerk und die erwartete centrosomale Lokalisation von CAP350 (Abb. 18A und D). Nach der Nocodazol Behandlung ist das Mikrotubuli-Netzwerk vollständig depolymerisiert, da der β -Tubulin Antikörper keine netzwerkartigen Strukturen, sondern nur noch diffuse Färbung im Cytoplasma zeigt (Abb. 18B und E). Trotz der Depolymerisation der Mikrotubuli kann das CAP350 Signal in einigen Zellen immer noch ganz schwach punktförmig am Zellkern, also wahrscheinlich centrosomal, detektiert werden (Abb. 18B und 18E nicht überexprimierende Zellen).

Ersetzt man das Nocodazol haltige Medium durch normales Medium und läßt die Zellen bei 37 °C regenerieren, so bildet sich zum einen das Mikrotubuli-Netzwerk wieder vollständig aus, zum anderen bindet CAP350 wieder in etwa genauso stark wie bei unbehandelten Zellen ans Centrosom (vergl. Abb. 18A und C).

Ein intaktes Mikrotubuli-Netzwerk fördert somit die Bindung von CAP350 am Centrosom. Allerdings erfolgt die centrosomale Bindung möglicherweise nicht ausschließlich über die Mikrotubuli, sondern auch über andere Faktoren, da trotz vollständiger Depolymerisation der Mikrotubuli ein CAP350 Signal trotzdem am Centrosom auszumachen ist.

Da CAP350 zwar größtenteils centrosomal, jedoch auch in geringem Umfang netzwerkartig in der Nähe der Mikrotubuli vorliegt (Abb. 18D, Pfeilspitzen) und da stark CAP350 überexprimierende Zellen häufig eine netzwerkartige CAP350 Lokalisation aufweisen (Abb. 18F und 19B), sollte die Mikrotubuliabhängigkeit der netzwerkartigen CAP350 Lokalisation analysiert werden. Hierzu wurden transient CAP350 überexprimierende Zellen 13 h mit 5 μ M Nocodazol behandelt und das überexprimierte Protein in der Immunfluoreszenz nachgewiesen (Abb. 18E). Trotz der Nocodazolbehandlung liegt CAP350 cytoplasmatisch und netzwerkartig, wenn auch in geringerem Ausmaß als ohne Nocodazolbehandlung, vor. Offensichtlich erfolgt die netzwerkartige Lokalisation von CAP350 nicht ausschließlich über die Mikrotubuli. Ersetzt man das Nocodazol haltige Medium durch normales Medium und läßt die transient CAP350 exprimierenden Zellen für weitere 2 h bei 37 °C regenerieren, so bildet sich das Mikrotubulinetzwerk wieder vollständig aus (Abb. 18F). CAP350 scheint teilweise direkt mit den Mikrotubuli zu kolokalisieren, teilweise scheint CAP350 jedoch auch nur in direkter Nachbarschaft zu den Mikrotubuli vorzuliegen.

Zusammenfassend zeigen die Untersuchungen mit Nocodazol, daß CAP350 teilweise mit den Mikrotubuli kolokalisiert und daß CAP350 überexprimierende Zellen offensichtlich auch ohne funktionelle Mikrotubuli netzwerkartige Strukturen ausbilden.

3.9.3 Lokalisationsstudien mit CAP350 Deletionsmutanten

Zur Bestimmung der Sequenzelemente von CAP350, die für die Lokalisation verantwortlich sind, wurden CAP350 Deletionsmutanten in HEK293 Zellen überexprimiert. Durch eine Doppelfärbung mit Antikörpern gegen das myc-Tag bzw. gegen das His-Tag der transfizierten CAP350 Deletionsmutanten wie auch gegen γ -Tubulin konnten die zellulären Lokalisationen der Deletionskonstrukte in der Immunfluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden. Der Aufbau der eingesetzten Deletionskonstrukte ist in Abb. 19A schematisch dargestellt.

Eine Überexpression des Vollängenproteins CAP350 zeigt eine starke, netzwerkartige Färbung im Cytoplasma, wobei das Netzwerk vom Centrosom, welches durch die γ -Tubulin Färbung klar zu erkennen ist, auszugehen scheint (Abb. 19B). Neben der netzwerkartigen Lokalisation erkennt man auch punktförmige CAP350 Lokalisationen um den Zellkern herum (Abb. 19B). In Abb. 19C ist eine CAP350 überexprimierende mitotische Zelle dargestellt. Bei dieser ist eindeutig eine Kolokalisation des überexprimierten CAP350 Proteins an den mitotischen Mikrotubuli zu erkennen. Die am C-Terminus deletierte Mutante CAP350(As 1-1928) zeigt eine mit dem Vollängenprotein vergleichbare Lokalisation (Abb. 19D,E), da ebenfalls eine netzwerkartige Lokalisationen erkennbar ist. Eine Lokalisation dieser Deletionsmutante an das Centrosom kann durch die Kolokalisation mit γ -Tubulin in der Prophasenzelle in Abb. 19E deutlich ausgemacht werden. Außerdem scheint bei dieser mitotischen Zelle das überexprimierte Deletionsprotein mit den Mikrotubuli zu kolokalisieren.

Die weiter C-terminal verkürzte Deletionsmutante CAP350(As 1-1427) weist ebenfalls eine Lokalisation auf, die mit der des Vollängenproteins vergleichbar ist (Abb. 19F). Auch diese C-terminale Deletionsmutante zeigt eine netzwerkartige Lokalisation im Cytoplasma, die jedoch nicht so ausgeprägt ist, wie die netzwerkartige Lokalisation bei Überexpression des Vollängenproteins. Teilweise kommt es auch zu diversen punktförmigen Anlagerungen im Cytoplasma. Eine Lokalisation dieser Deletionsmutante am Centrosom ist deutlich schwächer auszumachen als bei der Überexpression des Vollängenproteins, ist aber trotzdem noch nachzuweisen (Abb. 19F).

Verkürzte man den C-terminalen Bereich um weitere 444 Aminosäuren, so zeigt diese CAP350(As 1-983) Deletionsmutante nur noch eine bruchstückartige, teilweise auch leicht netzwerkartige Lokalisation direkt am oder möglicherweise auch im Zellkern (Abb. 19G). In mitotischen Zellen lagert sich diese Deletionsmutante in den Bereichen der Centrosomen, aber auch im Bereich der Mikrotubuli faserartig an (Abb. 19H).

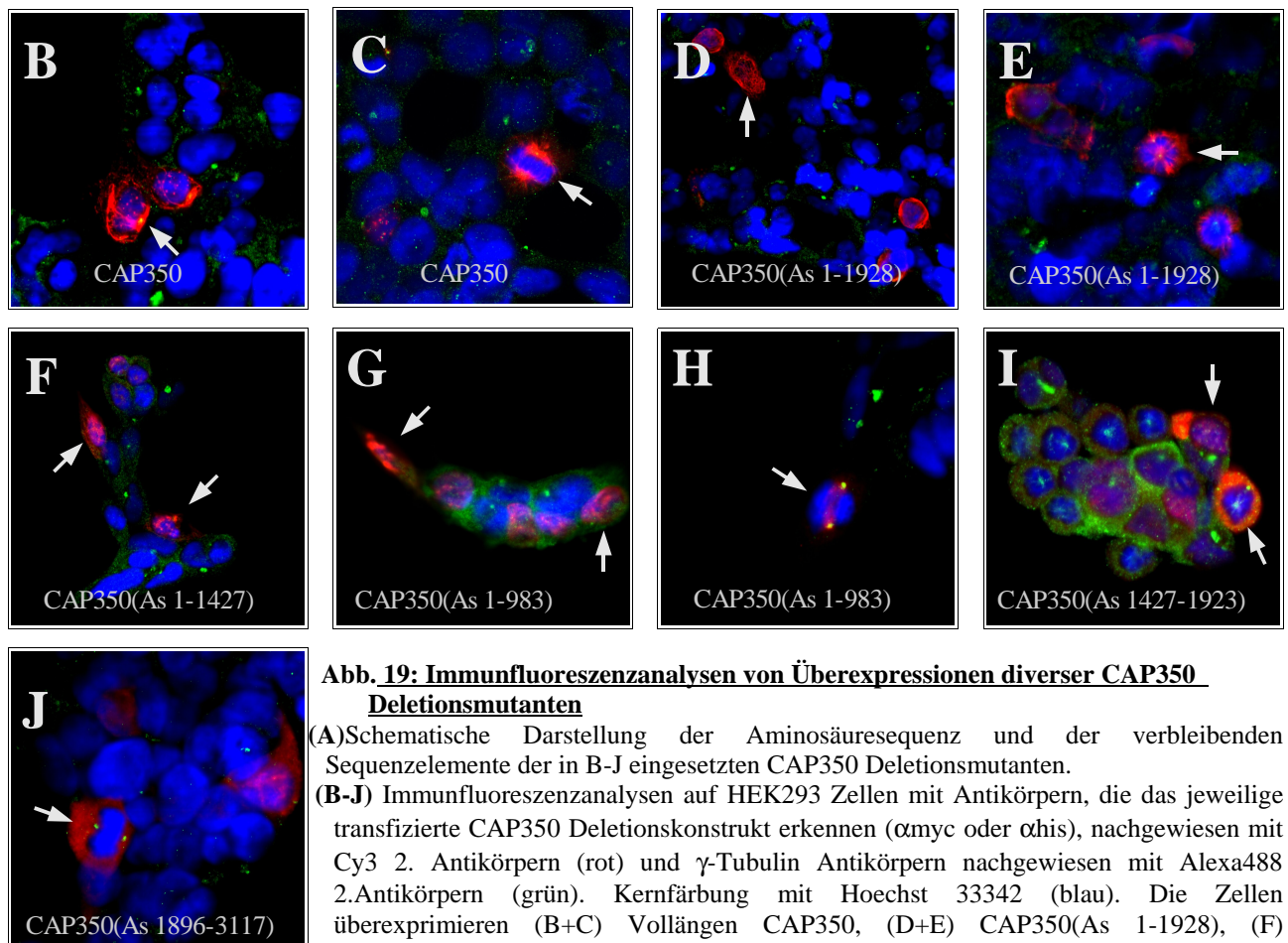
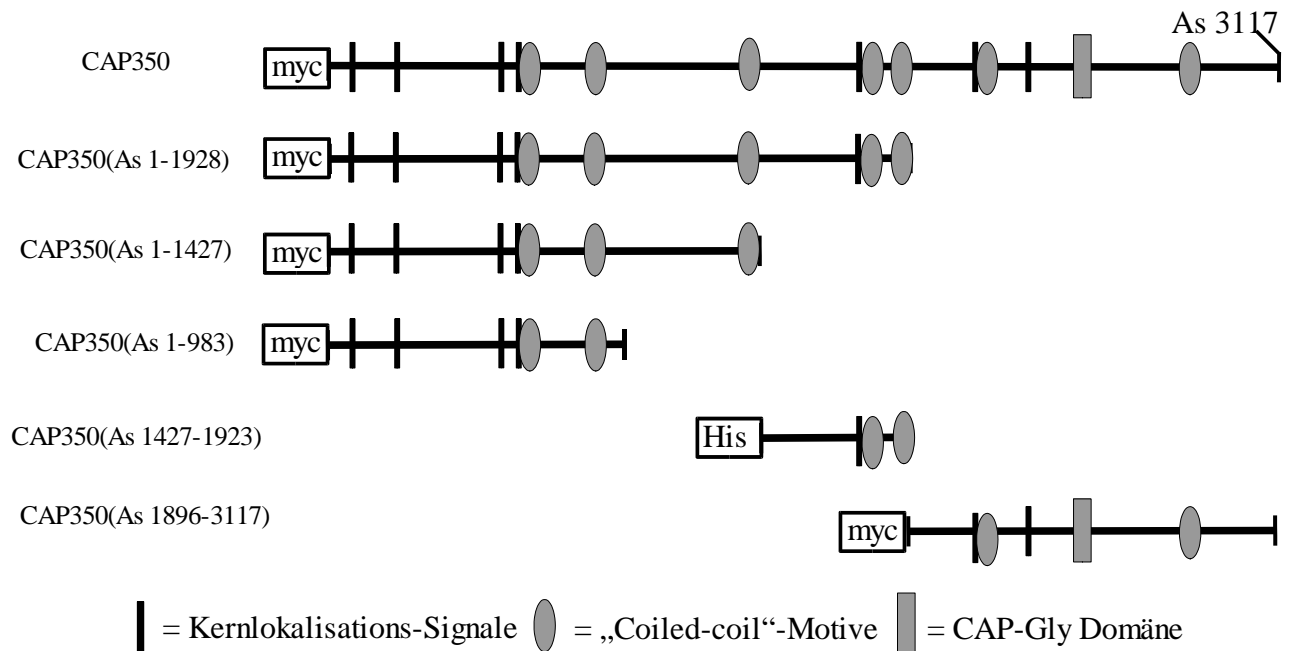
A

Abb. 19: Immunfluoreszenzanalysen von Überexpressionen diverser CAP350 Deletionsmutanten

(A) Schematische Darstellung der Aminosäuresequenz und der verbleibenden Sequenzelemente der in B-J eingesetzten CAP350 Deletionsmutanten.

(B-J) Immunfluoreszenzanalysen auf HEK293 Zellen mit Antikörpern, die das jeweilige transfizierte CAP350 Deletionskonstrukt erkennen (α myc oder α his), nachgewiesen mit Cy3 2. Antikörpern (rot) und γ -Tubulin Antikörpern nachgewiesen mit Alexa488 2. Antikörpern (grün). Kernfärbung mit Hoechst 33342 (blau). Die Zellen überexprimieren (B+C) Vollängen CAP350, (D+E) CAP350(As 1-1928), (F) CAP350(As 1-1427), (G-H) CAP350(As 1-983), (I) CAP350(As 1427-1923) bzw. (J) CAP350(As 1896-3117). Die im Text beschriebenen Zellen sind durch Pfeile markiert.

Eine N- und C-terminale Deletionsmutante, die nur die CAP350 Aminosäuren 1427 bis 1923 umfaßt, zeigt nur noch eine schwach faserartige oder diffuse Lokalisation am oder im Kern und cytoplasmatische Färbung in mitotischen Zellen (Abb. 19I). Eine centrosomale Lokalisation dieser Deletionsmutante ist nur noch sehr schwach in mitotischen Zellen auszumachen.

Eine Überexpression des C-terminal gelegenen CAP350(As 1896-3117) Anteils, der die CAP-Gly Domäne von CAP350 umfaßt, zeigt nur noch cytoplasmatische Lokalisation, die teilweise leicht netzwerkartig erscheint (Abb. 19J). Eine Kolokalisation mit γ -Tubulin ist auch in mitotischen Zellen nicht erkennbar.

Die Ergebnisse sind in der Tabelle 3 nochmals aufgeführt. Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die C-terminalen Aminosäuren 1896 bis 3117 von CAP350 nicht für die centrosomale Lokalisation von CAP350 notwendig sind. Obwohl die CAP350 Deletionsmutanten CAP350(As 1-983) und CAP350(As 1427-1923) schwache centrosomale Lokalisation in mitotischen Zellen zeigen, weist eine Überexpression des gesamten N-terminale Anteils von CAP350 wesentlich stärkere centrosomale Lokalisation auf. Wahrscheinlich sind mehrere N-terminale Sequenzelemente für die centrosomale Lokalisation notwendig.

Mutante	Kolokalisation mit dem Centrosom	Netzwerkartige Lokalisation
CAP350	++	++
CAP350(As 1-1928)	+	++
CAP350(As 1-1427)	+	+
CAP350(As 1-983)	+ (in mitotischen Zellen)	+/-
CAP350(As 1427-1923)	+/-	-
CAP350(As 1896-3117)	-	+/-

Tabelle 3: Zusammenfassung der zellulären Lokalisationen der CAP350 Deletionsmutanten

Tabellarische Auflistung der centrosomalen Lokalisation und der Ausbildung netzwerkartiger Strukturen von CAP350-Deletionsmutanten. Ausgewertet wurden nicht nur die in Abb. 19 gezeigten Immunfluoreszenzaufnahmen, sondern auch weitere nicht gezeigte Aufnahmen. Die Bewertung der Lokalisationen der einzelnen Deletionsmutanten erfolgt mit ++ (starke Lokalisation) über +/- (noch schwach erkennbare Lokalisation) bis - (keine Lokalisation).

3.9.4 Der Einfluß von CAP350-Überexpression auf den Zellzyklus

Da es sich bei CAP350 um ein centrosomal assoziiertes Protein handelt und das Centrosom ein entscheidendes Zellorganell für die Zellteilung ist, wurden Überexpressionsstudien von CAP350 mit nachfolgender Zellzyklusanalyse per FACS Analyse durchgeführt. Eine erhebliche Überexpression eines centrosomalen Proteins könnte durch „Sequeleing“ andere regulatorische Faktoren am Centrosom wegfangen oder andere centrosomale Proteine an ihrer Aufgabe hindern und somit die Zellteilung beeinflussen.

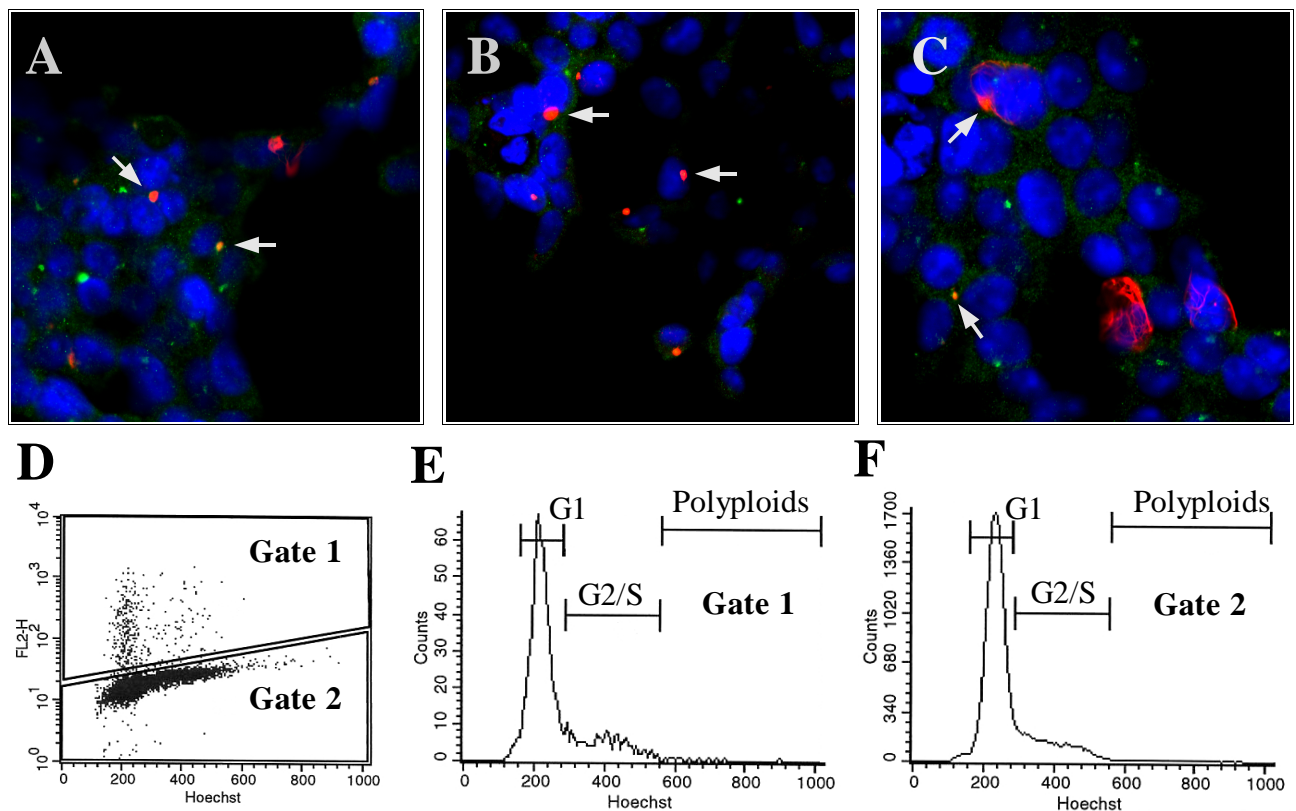


Abb. 20: Zellzyklusanalyse von CAP350(As 1-1928)-DsRed überexprimierender Zellen

(A-C) Immunfluoreszenzanalysen auf mit CAP350(As 1-1928)-DsRed (rot) transient transfizierten HEK293 Zellen.

In (A) wurde zusätzlich zu der Eigenfluoreszenz des Ds-Red Fusionsproteins γ -Tubulin, in (B) Centrin2 und in (C) Centrin3 mit Alexa488 2. Antikörpern (grün) nachgewiesen. Kernfärbung mit Hoechst 33342 (blau). Kolokalisationen zwischen dem überexprimierenden Ds-Red Fusionsprotein und den nachgewiesenen centrosomalen Proteinen werden durch Pfeile dargestellt.

(D-F) FACS Analyse in dem FACS-Sorter Scan Advantage der Firma Becton and Dickinson von mit CAP350(As 1-1928)-DsRed (rot) transient transfizierten HEK293 Zellen. Die Auswertung erfolgte mit der Software CELLquest. In (D) ist die Einteilung der transfizierten leuchtenden Zellen (Gate 1) und der untransfizierten nicht leuchtenden Zellen (Gate 2) mittels der Software dargestellt, wobei auf der X-Achse die Intensität der Kernfärbung und auf der Y-Achse die Intensität der roten Fluoreszenz aufgetragen wurde. Die Zellzyklusbestimmung der transfizierten-leuchtenden (D, Gate 1) bzw. der nicht transfizierten Zellen (D, Gate 2) ist in E und F dargestellt. Die X-Achse zeigt dabei die DNA-Menge und die Y-Achse die Anzahl der Zellen an. Anhand der DNA-Menge konnte so die Anzahl der Zellen in der G1- und der G2/S-Phase und auch die Anzahl der polyploiden Zellen bestimmt werden.

Hierzu wurden HEK293 Zellen mit einem CAP350(As 1-1928)-DsRed Fusionsprotein transfiziert, da das Vollängen CAP350-DsRed Fusionsprotein nicht fluoreszierte. In einem FACS-Sorter Scan Advantage der Firma Becton and Dickinson konnten so die transfizierten leuchtenden Zellen von den nicht transfizierten unterschieden werden.

Um zu testen, ob dieses DsRed-Fusionsprotein noch die gleiche zelluläre Lokalisation wie CAP350 bzw. wie die Deletionsmutante CAP350(As 1-1928) aufweist, wurden transient CAP350(As 1-1928)-DsRed überexprimierende Zellen zusätzlich mit anderen centrosomalen Antikörpern in der Immunfluoreszenzanalyse untersucht. Bei schwach exprimierenden transfizierten Zellen ist sowohl eine Koloalisation mit γ -Tubulin als auch mit Centrin 2 und Centrin 3 nachweisbar (Abb. 20A-C). Stark überexprimierende Zellen zeigen ähnlich wie stark überexprimierende CAP350 bzw. CAP350(As 1-1928) Zellen netzwerkartige oder punktuelle Expression am Zellkern (Abb. 20C). Da die zelluläre Lokalisation von CAP350(As 1-1928)-DsRed der Lokalisation des Vollängen CAP350 gleicht und so eine Interaktion des DsRed-Fusionsproteins mit anderen centrosomalen und für den Zellzyklus notwendigen Proteinen möglich ist, ist ein Einsatz dieser Fusionsdeletionsmutante in der FACS Analyse gerechtfertigt.

Nach einer Hoechst 33342 Färbung konnte die Zellzyklusaufteilung der transfizierten und der untransfizierten Zellen bestimmt werden (vergleiche E mit F). Von den transfizierten leuchtenden Zellen befinden sich 81 % in der G1-, 16 % in G2/S-Phase, während 0,4 % der Zellen polyploid sind. Von den nicht transfizierten Zellen befinden sich 77 % in der G1-, 21 % in G2/S-Phase, und 0,5 % der Zellen sind polyploid. Der prozentuale Anteil der Zellen in der G1 bzw. G2/S Phase unterscheidet sich bei transfizierten und bei nicht transfizierten Zellen somit nicht signifikant.

Die Expression des CAP350(As 1-1928)-DsRed Fusionsproteins hatte somit keinen nachweisbaren Effekt auf den Zellzyklus und erhöht nicht den Anteil der polyploiden Zellen.

3.10 Die Expression von CAP350 in unterschiedlichen Zelllinien

Um die Expression von CAP350 mRNA in unterschiedlichen Zelltypen zu untersuchen, wurden von HEK293, HepG2, HeLa, 208F/WT und FTO2B Zellen RNA-Präparationen erstellt und anschließend RT-PCR Analysen durchgeführt. Für die Reverse-Transkription wurden Oligo-dT Primer eingesetzt. Der verwendete genspezifische 5'-Primer hybridisiert an der Position 4213-4235 (Primer1) und der genspezifische 3'-Primer an der Position 5691 - 5714 (Primer 2) der humanen Sequenz (vergl. DNA-Sequenz, Anhang 1), so daß die in der PCR Reaktion erstellte DNA 1501 bp groß sein sollte.

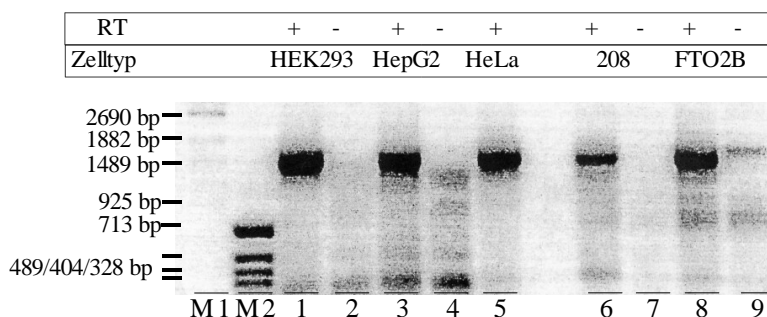


Abb.21: RT-PCR Reaktionen zum Nachweis von CAP350 RNA aus Zellkulturzellen

RT-PCR Reaktion auf isolierter RNA von HEK293, HepG2, HeLa, 208 und FTO2B Zellen. Bei der RT Reaktion wurden Oligo-dT Primer eingesetzt. Es wurde jeweils eine RT positiv und RT negativ Reaktion (außer bei HeLa Zellen) durchgeführt. In der PCR Reaktion wurden CAP350 spezifische Primer eingesetzt, die eine DNA von 1501 bp ergaben. Die Auftrennung der in der PCR Reaktion erstellten DNA erfolgte auf einem 1 % Agarosegel. Größenstandards sind angegeben (M1 und M2).

In allen getesteten Zelllinien ist das CAP350 Signal in der erwarteten Größe nachweisbar (Abb. 21). Da die RT Negativkontrollen alle negativ sind und da das in der PCR Reaktion erstellte DNA Fragment auf genomischer DNA-Sequenz Intron-überspannend liegt (vergl. Tabelle 1), sind die entsprechenden CAP350 Signale nicht genomischen Ursprungs, sondern beruhen auf der transkribierten RNA des CAP350 Gens.

Um neben der CAP350 RNA-Expression auch das CAP350 Protein nachzuweisen, wurden Immunfluoreszenzanalysen mit affinitätsgereinigten CAP350 (Ep76) Antikörpern auf HepG2, EMFI, 208F/WT und FTO2B Zellen durchgeführt (Abb. 22A-D). In allen Zellen ist mit dem CAP350 Antikörper Ep76 eine centrosomale Lokalisation von CAP350 erkennbar. Außerdem ist die Sequenzhomologie des humanen und des Nagetier CAP350 Proteins so groß, daß der gegen das humane CAP350 gerichtete Antikörper Ep76 auch das Ratten- und Maus-Homolog erkennt. Um auszuschließen, daß es sich bei dem centrosomalen CAP350 Antikörpersignal um unspezifische Signale handelt, wurden die entsprechenden Zelllinien in Immunfluoreszenzanalysen mit Präimmunseren des entsprechenden Kaninchens untersucht (Abb. 22A-D, verkleinerte Darstellungen, jeweils rechts unten). Bei keiner untersuchten Zelllinie zeigt das Präimmunserum centrosomale Färbung. Somit ist das centrosomale CAP350 Antikörpersignal spezifisch.

CAP350 konnte demnach in allen untersuchten Zelllinien auf RNA Ebene detektiert und auf Proteinebene in allen untersuchten Zelllinien centrosomal nachgewiesen werden.

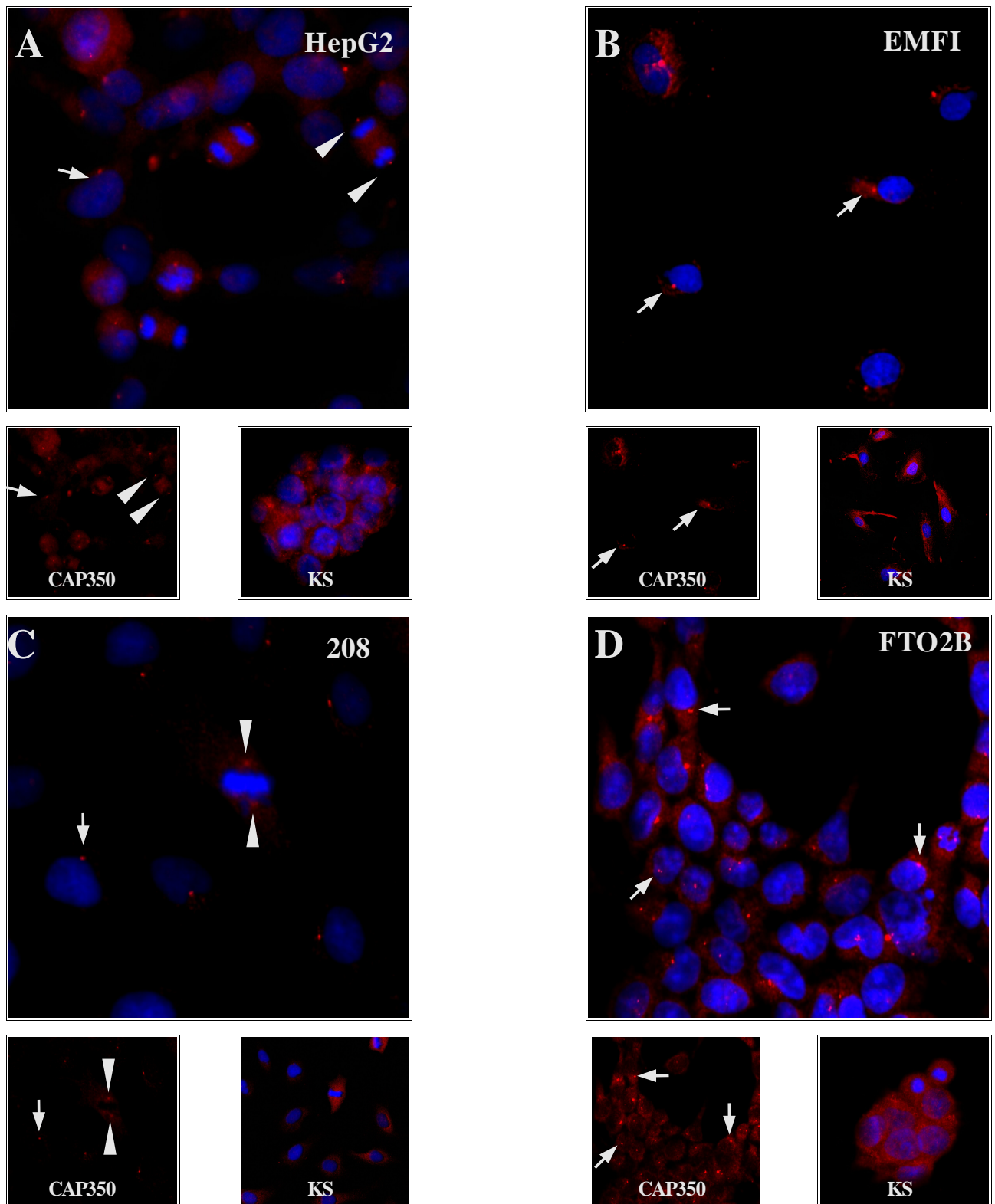


Abb. 22: Immunfluoreszenzaufnahmen mit CAP350 Antikörpern auf Zellkulturzellen

Immunfluoreszenzanalysen auf humanen HepG2-Zellen (A), Maus EMFI-Zellen (B) und Ratten 208- und FTO2B Zellen (C und D) mit CAP350 Antikörpern (Ep76), nachgewiesen mit Cy3 2. Antikörpern (rot). Kernfärbung mit Hoechst 33342 (blau). Beispielhaft sind Zellen mit deutlichen centrosomalen CAP350 Signalen markiert. Pfeile zeigen auf Interphasen und Pfeilspitzen auf mitotische Zellen. Die verkleinerten Abbildungen links zeigen den roten Immunfluoreszenzkanal, die verkleinerten Abbildungen rechts eine Immunfluoreszenzanalyse auf den entsprechenden Zellen mit Kontrollserum (KS).

3.11 Die Expression von CAP350 in unterschiedlichen Geweben

3.11.1 Die mRNA und Protein Expression von CAP350 in der Spermio-genese

Da Dr. Schwerk eine besonders hohe CAP350 mRNA Expression im adulten Hoden nachweisen konnte, sollte eine mögliche Entwicklungsstadium-spezifische mRNA Expression von CAP350 analysiert werden. Hierzu wurden RT-PCR Reaktionen auf Rattenhodens RNA und parallel dazu RT-PCR Reaktionen auf Zwölffingerdarm- und Leber-RNA von Ratten in unterschiedlichen Altersstadien durchgeführt. Die verwendeten Ratten waren 8 Tage, 5 Wochen (Beginn der Pubertät), 7 Wochen (Pubertät) oder 15 Wochen (adultes Tier) alt. Zur reversen Transkription wurden sowohl Oligo dT Primer, als auch random Primer eingesetzt. Für die PCR Reaktion wurden zwei auf die Rattensequenz perfekt hybridisierende Primer eingesetzt, die ein internes CAP350 PCR-Fragment von 836 Nukleotiden ergeben sollten (Primer 3+4, Hybridisierungsposition in humaner Sequenz vergl. Anhang 1). Als Kontrolle wurde jeweils eine RT negativ PCR Reaktion durchgeführt.

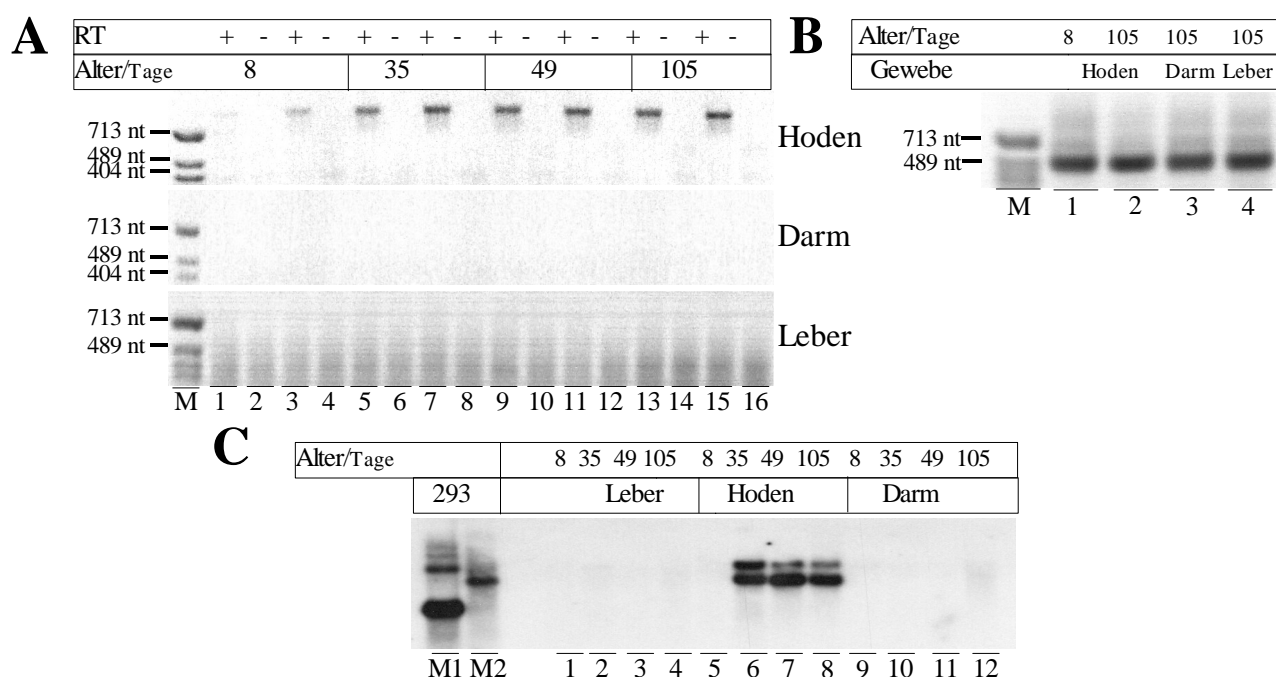


Abb. 23: CAP350 RNA Detektion in unterschiedlichen Rattengeweben

- (A) RT-PCR Reaktionen auf Hoden-, Darm- bzw. Leber-RNA von Ratten unterschiedlichen Alters. Es wurde jeweils eine Reverse-Transkriptase positiv bzw. negativ Reaktion durchgeführt, bei der in den Spuren 1,2,5,6,9,10,13,14 Oligo dT Primer und in den Spuren 3,4,7,8,11,12,15,16 random Primer verwendet wurden. Nachgewiesen wurde eine interne CAP350 mRNA Sequenz unter Verwendung der Primer 3 und 4, die auf der Rattensequenz an den Positionen 1954 bp und 2790 bp perfekt hybridisieren und ein PCR Fragment von 836 bp Größe ergeben (vergl. Hybridisierungsposition in humaner Sequenz, Anhang 1). Die Auftrennung der in der PCR erstellten DNA erfolgte auf einem 1 % Agarosegel.
- (B) Kontroll RT-PCR auf Ratten Hoden (Spuren 1+2), Darm (Spur 3) und Leber (Spur 4) RNA von Ratten im Alter von 8 Tagen (Spur 1) bzw. 105 Tagen (Spuren 2-4). Nachgewiesen wurde eine interne GAPDH Sequenz, die ein PCR Fragment von 451 bp Größe ergab. Die Auftrennung der DNA erfolgte auf einem 1 % Agarosegel.
- (C) Northernblotanalyse auf Hoden-, Darm- bzw. Leber RNA von Ratten unterschiedlicher Altersstadien. Die RNA wurde auf einem denaturierendem 1,0 % Agarosegel aufgetrennt, geblottet, mit einer radioaktiv markierten CAP350 spezifischen Sonde hybridisiert und durch eine Autoradiographie sichtbar gemacht. In Spur M1 wurde RNA von mit CAP350(As 1-1928) und in Spur M2 RNA von mit Vollängen CAP350 transfizierten HEK293 Zellen aufgetragen.

Die RT-PCR auf Ratten-Hoden-RNA ergab die erwarteten PCR-Produkte in allen getesteten Altersstadien, wobei die CAP350 RNA Konzentration in Ratten, die noch nicht in die Pubertät gelangt sind, deutlich geringer als bei den übrigen getesteten Ratten ist (Abb. 23A). Da die RT Negativkontrollen alle kein Signal zeigen, kann ausgeschlossen werden, daß die entsprechenden CAP350 Signale genomischen Ursprungs sind. Die CAP350 Signale in der RT-PCR Reaktion beruhen demnach auf der transkribierten RNA des CAP350 Gens in der Ratte.

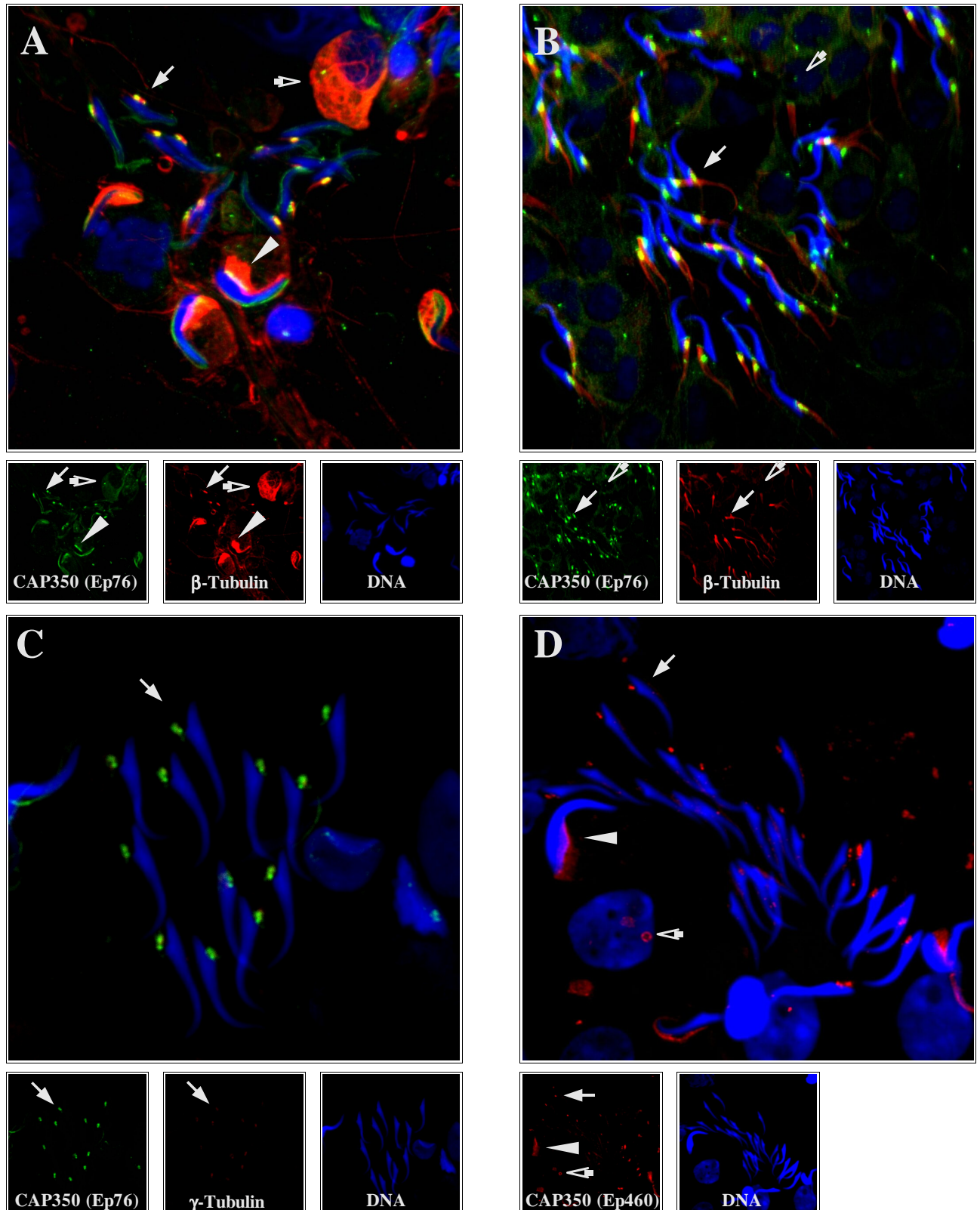
Die RT-PCR auf Ratten Zwölffingerdarm und Rattenleber RNA zeigt kein Genprodukt. Um auszuschließen, daß die Ursache für die negativen Zwölffingerdarm- und Leber-RT-PCR Ergebnisse auf Degradation der Ratten RNA zurückzuführen sind, wurden GAPDH RT-PCR Reaktionen von ausgewählten Rattengewebe RNAs durchgeführt (Abb. 23B). Sowohl auf Rattenhoden RNA, wie auch auf Zwölffingerdarm und Leber RNA ist das GAPDH PCR Produkt deutlich in vergleichbarer Intensität nachweisbar. RNA Degradation als Ursache für den negativen RT-PCR Befund auf Ratten Zwölffingerdarm- und Ratten Leber-RNA scheint demnach wenig wahrscheinlich. Bestätigt wurden die Ergebnisse der RT-PCR auch in Northernblotanalysen (Abb. 23C). Hier zeigte sich ebenfalls, daß CAP350 verstärkt in Hodengewebe von Ratten ab Beginn der Pubertät exprimiert wird. Transkripte sind jedoch auch schwach in Leber und Lunge nachweisbar. Von der Sonde werden jeweils zwei sehr große Transkripte detektiert, wobei das kleinere Transkript das prominentere darstellt.

Da die Konzentration der CAP350 RNA in Hoden nach dem Beginn der Pubertät, also nach dem Beginn der Spermiogenese, wesentlich größer als vor der Pubertät ist und da die RNA-Expression von CAP350 in Hodengewebe auch wesentlich größer ist als in den anderen untersuchten Geweben, könnte dies ein Indiz für die Beteiligung von CAP350 an der Spermiogenese sein.

In der Spermiogenese teilen sich die Stammzellen und bilden so die Spermatogonien, die kurz nach ihrer Bildung die DNA erneut verdoppeln und so einen 4n Chromosomensatz bilden. In der ersten meiotischen Teilung bilden sich die sekundären Spermatocyten, aus denen nach der zweiten meiotischen Teilung die Spermatiden, die einen haploiden Chromosomen Satz enthalten, hervorgehen. Die Spermatiden reifen im Laufe der Spermiogenese und bilden so die Spermien.

Um die zelluläre Lokalisation von CAP350 im Hodengewebe und um die Beteiligung von CAP350 an der Spermiogenese zu überprüfen, wurden Rattenhoden-Quetschpräparate angefertigt und diese in der Immunfluoreszenzanalyse mit dem epitopgereinigten CAP350 Antikörper Ep76 und dem Maus-monoklonalen β -Tubulin Antikörper in einer Doppelfärbung untersucht (Abb. 24A-C).

Die reifen Spermatiden in Abb. 24A zeigen eine CAP350 Lokalisation hauptsächlich an den beiden Centriolen des Centrosoms. Ein geringer Anteil des CAP350 Proteins scheint auch in direkter Nachbarschaft zum stark kondensierten Zellkern zu liegen.



24: Immunfluoreszenzanalysen auf Rattenhoden-Quetschpräparaten

Immunfluoreszenzanalyse auf Rattenhoden-Quetschpräparaten mit CAP350 Antikörpern Ep76 (A–C), nachgewiesen mit Alexa488 (grün) gekoppelten 2. Antikörpern bzw. mit CAP350 Antikörpern Ep460 (D) nachgewiesen mit Cy3 gekoppelten 2. Antikörpern (rot). In A und B wurde außerdem β -Tubulin und in C γ -Tubulin mit Cy3 gekoppelten 2. Antikörpern (rot) nachgewiesen. Kernfärbung mit Hoechst 33342 (blau). In den verkleinerten Abbildungen sind die einzelnen Immunfluoreszenzkanäle dargestellt. Die Pfeile zeigen reife Spermatiden, die Pfeilspitzen Spermatiden im Manschettenstadium und die offenen Pfeile zeigen wahrscheinlich Spermatogonien oder Spermatocyten.

In den weniger reifen Spermatiden, die eine noch nicht so starke Kondensation des Kerns aufweisen, liegt CAP350 hauptsächlich in direkter Nachbarschaft des Zellkerns vor. Die Manschette, in der die Mikrotubuli in einer zylindrischen Hülle am Zellkern vorliegen, erkennt man durch die faserartige β -Tubulinfärbung, wobei am Ausgangspunkt der Tubuline eine starke Kolokalisation mit CAP350 zu erkennen ist (Abb. 24A). In den Spermatocyten bzw. Spermatogonien (eine genaue Einteilung der Zellen ist ohne Kenntnis der zellulären Lokalisation im Gewebe nicht möglich) erkennt man, wie auch schon in den Zellkulturzellen, eine Färbung der beiden Centriolen des Zellkerns (Abb. 24A).

In Abb. 24B erkennt man zusätzlich, daß die Mikrotubulifasern in den reifen Spermatiden von deren Centrosomen, welche durch die CAP350 Färbung ausgemacht werden können, ausgehen.

In einer CAP350 / γ -Tubulin Doppelfärbung sollte die vermutete centrosomale Lokalisation von CAP350 überprüft werden (Abb. 24C). CAP350 zeigt in den reifen Spermatiden eine klare Kolokalisation mit γ -Tubulin. CAP350 bindet demnach auch in der Spermiogenese spezifisch an das Centrosom.

Um auszuschließen, daß es sich bei dem centrosomalen Signal des CAP350 Antikörpers Ep76 um unspezifische Bindungen handelt, wurde eine Immunfluoreszenzanalyse mit einem CAP350 Antikörper, der einen anderen Bereich des CAP350 Proteins erkennt, durchgeführt (Abb. 24D). Der ebenfalls affinitätsgereinigte Antikörper Ep460 zeigt in den reifen Spermatiden ebenfalls eine centrosomale Färbung, wobei man auch mit diesem Antikörper die beiden Centriolen deutlich erkennen kann. Schwach erkennbar ist auch die CAP350 Lokalisation direkt am Zellkern. In den weniger reifen und somit größeren Spermatiden (Abb. 24D) zeigt der Ep460 Antikörper eine leichte Färbung an der Manschette. Möglicherweise liegt CAP350 auch an den Mikrotubuli der Manschette gebunden vor.

Da die beiden CAP350 Antikörper vergleichbare Lokalisationen zeigen, scheinen die Antikörper Reaktionen spezifisch zu sein und bestätigen die centrosomale Lokalisation von CAP350 auch in der Spermiogenese.

Um die exakte Morphologie der CAP350 Lokalisation im Hodengewebe zu untersuchen, wurden Paraffinschnitte von Rattenhodengewebe in Zusammenarbeit mit der Pathologie des Universitätsklinikums Essen angefertigt und diese nach der Deparaffinierung und Hydrierung in Doppelfärbungsanalysen mit CAP350 Antikörpern und mit einem β -Tubulin erkennenden Antikörper in Immunfluoreszenzreaktionen analysiert. Auf Paraffinschnitten zeigt der Ep460 Antikörper weder in Sertolizellen, Spermatogonien, Spermatocyten noch in den Spermatiden eine klare centrosomale CAP350 Lokalisation (Abb. 25A).

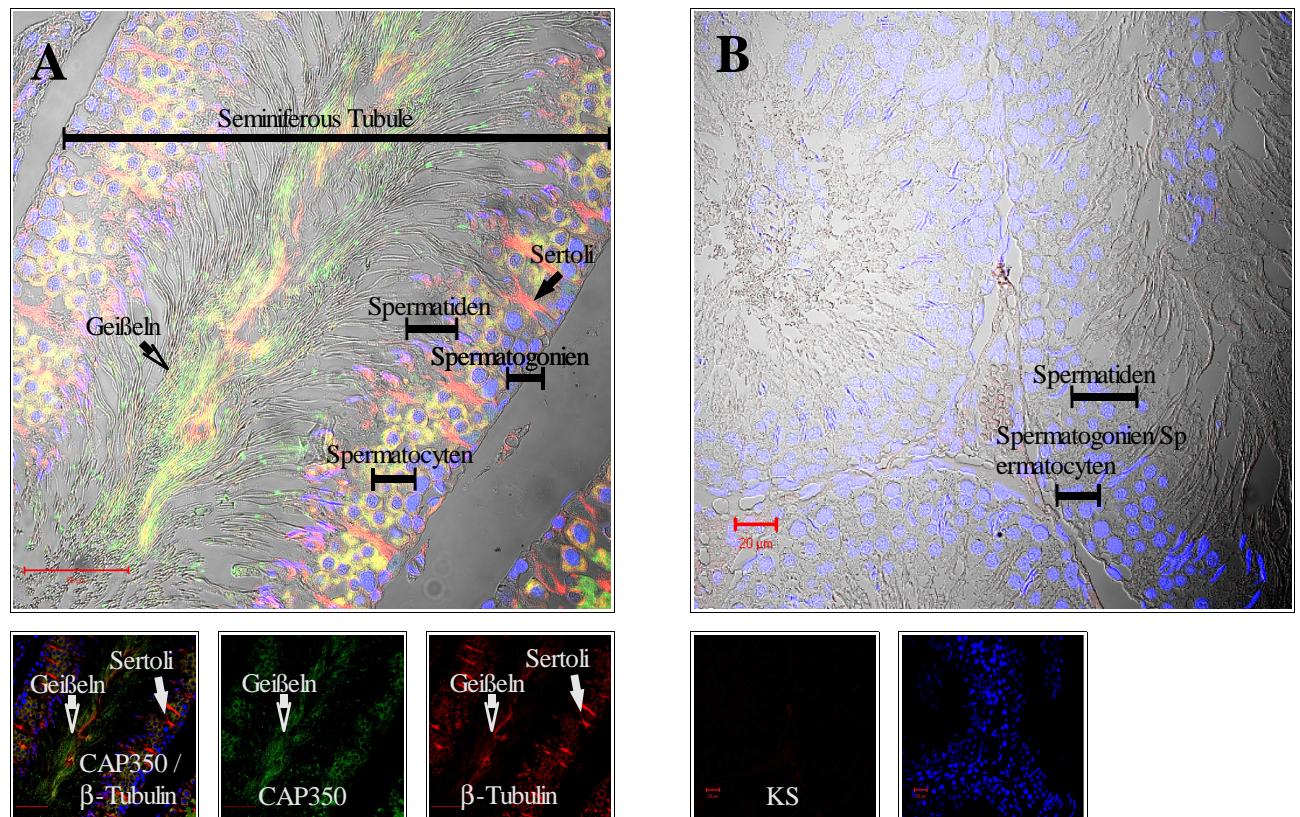


Abb. 25: Immunfluoreszenzanalysen auf Paraffin-Rattenhodenschnitten

- (A)** Immunfluoreszenzanalyse auf Paraffin-Rattenhodenschnitten, überlagert im Durchlicht mit CAP350 Antikörpern (Ep460), nachgewiesen mit Alexa488 gekoppelten 2. Antikörpern (grün) und mit β -Tubulin Antikörpern nachgewiesen mit Cy3 gekoppelten 2. Antikörpern (rot). Kernfärbung mit Hoechst 33342 (blau). Der Größenbalken ist 50 μ m lang. Bereiche bestimmter Zelltypen sind durch Balken, Sertolizellen durch Pfeile und Geißeln durch offene Pfeile markiert. In den verkleinerten Abbildungen ist die Überlagerung der rot/blau/grün Kanäle und jeweils der rote bzw. grüne Kanal dargestellt.
- (B)** Immunfluoreszenzanalyse auf Paraffin-Rattenhodenschnitten überlagert im Durchlicht mit Kontrollserum (KS) nachgewiesen mit Cy3 gekoppelten 2. Antikörpern (rot). Kernfärbung mit Hoechst 33342 (blau). Der Größenbalken ist 20 μ m lang. Bereiche bestimmter Zelltypen sind durch Balken markiert. In den verkleinerten Abbildungen wird jeweils der rote bzw. blaue Immunfluoreszenz Kanal dargestellt.

Eine Kolokalisation zu den Mikrotubuli zeigt der Ep460 Antikörper jedoch in den Spermatozyten. Beide Antikörper zeigen in diesen Zellen eine diffuse cytoplasmatische Färbung. Die Sertolizellen, bei denen sich die Mikrotubuli durch das gesamte Cytoplasma ziehen und die eine sehr starke β -Tubulinfärbung aufweisen, zeigen eine nur vergleichsweise schwache CAP350 Antikörperfärbung. Sowohl der CAP350 Antikörper als auch der β -Tubulin Antikörper zeigt jedoch eine starke Färbung in den Geißeln, wobei das Mittelstück der Geißeln deutlich schwächer gefärbt wird, als der Rest der Geißel.

Eine Kontrollfärbung mit einem IgG aus Präimmunserum (Kontrollserum) des entsprechenden Kaninchens zeigt unter gleichen Bedingungen kein spezifisches Signal (Abb. 25B).

Die Paraffineinbettung der Gewebe erhält zwar sehr gut das Gewebe, jedoch ist bekannt, daß viele Antikörper nach Deparaffinierung und Hydrierung ihr entsprechendes Epitop nicht oder nur noch unzureichend erkennen. Möglicherweise ist das Fehlen des centrosomalen CAP350 Antikörpersignals bei den Rattenhoden-Paraffinschnitten darauf zurückzuführen.

Im Vergleich zu Paraffinschnitten erhalten Gefrierschnitte die Morphologie des Gewebes zwar schlechter, dafür ist jedoch die Antikörperreaktion ebenso unproblematisch wie bei Zellkulturpräparaten.

Deshalb wurden Gefrierschnitte auf Ratten-Nebenhoden erstellt. In den Nebenhoden machen die Spermien im Laufe der Wanderung durch die stark verwundene Epididymis weitere Reifungsprozesse durch, um die volle Beweglichkeit und die Fähigkeit zur Befruchtung der Oocyten zu erlangen. Von Nagetieren ist zudem bekannt, daß im Laufe der Spermiogenese die Centrosomen abgebaut werden (Woolley and Fawcett, 1973). CAP350 sollte demnach in den Epididymis Zellen centrosomal, in den reifen Rattenspermien des Nebenhodens jedoch auf Grund des Fehlens der Centriolen nicht mehr centrosomal lokalisiert vorliegen können. Um dies zu überprüfen wurden auf den Ratten-Nebenhoden-Gefrierschnitten Immunfluoreszenzdoppelanalysen mit dem CAP350 erkennenden Antikörper Ep76 bzw. Ep460 und β -Tubulin Antikörpern durchgeführt (Abb. 26A und B).

Der CAP350 Antikörper Ep76 erkennt in den umgebenden Zellen je nach Schnitt- und Fokussierungsebene punktförmige, wahrscheinlich centrosomale CAP350 Lokalisation am Zellkern, in den reifen Spermien sind jedoch keine centrosomalen Signale auszumachen (Abb. 26A). In den reifen Spermien scheint CAP350 nur noch schwach an der Kernmembran, und genau wie der Ep460 Antikörper auf den Rattenhoden-Paraffinschnitten gezeigt hat (Abb. 25A), in den Geißeln lokalisiert zu sein. Die β -Tubulin Färbung zeigt die bei der Gefrierschnittpräparation angeschnittenen Geißeln der Spermien.

Der CAP350 Antikörper Ep460 erkennt ebenfalls keine centrosomale Färbung in den reifen Spermien (Abb. 26B). Je nach Schnittebene erkennt man jedoch die punktförmige CAP350 Lokalisation am Kern in den umgebenden Zellen. Ähnlich wie bei den Paraffinschnitten auf Hodengewebe (Abb. 25A) zeigt der Ep460 Antikörper eine starke Färbung der Geißeln, die eine Kolokalisation zu den Tubulinen aufweist.

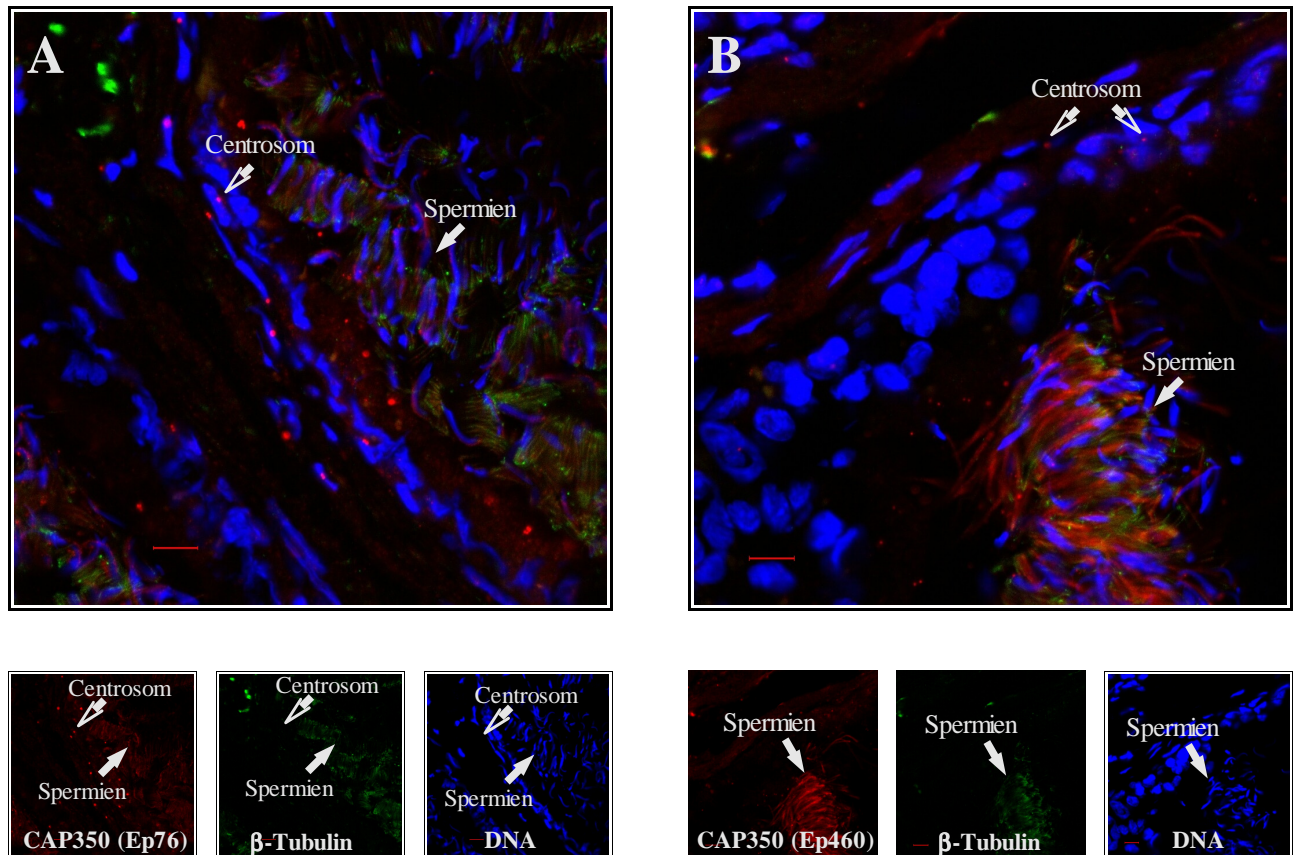


Abb. 26: Immunfluoreszenzanalysen auf Gefrierschnitten von Rattennebenhodengewebe

- (A)** Immunfluoreszenzaufnahme von Rattennebenhodengewebe mit CAP350 Antikörpern (Ep76), nachgewiesen mit Cy3 gekoppelten 2. Antikörpern (rot) bzw. mit β -Tubulin Antikörpern, nachgewiesen mit FITC gekoppelten 2. Antikörpern (grün). Kernfärbung mit Hoechst 33342 (blau). Der Größenbalken ist 10 μ m groß. Spermien sind mit Pfeilen und centrosomale Färbung mit offenen Pfeilen markiert. In den verkleinerten Abbildungen werden die einzelnen Kanäle dargestellt.
- (B)** Immunfluoreszenzaufnahme von Rattennebenhodengewebe mit CAP350 Antikörpern (Ep460), nachgewiesen mit Cy3 gekoppelten 2. Antikörpern (rot) bzw. β -Tubulin Antikörpern, nachgewiesen mit FITC gekoppelten 2. Antikörpern (grün). Kernfärbung mit Hoechst 33342 (blau). Der Größenbalken ist 10 μ m groß. Die Spermien sind mit Pfeilen und centrosomale Färbung mit offenen Pfeilen markiert. In den verkleinerten Abbildungen werden die einzelnen Kanäle dargestellt.

3.11.2 Die Proteinexpression von CAP350 in Leber und Lunge

Um zu testen, ob CAP350 entgegen den negativen RT-PCR Reaktionen (Abb. 23 A und C) auch in der Leber exprimiert wird, wurden Rattenleberquetschpräparate erstellt und diese mit CAP350 Antikörpern (Ep76) und β -Tubulin Antikörpern in der Immunfluoreszenz analysiert (Abb. 27A).

Alle dargestellten Zellen zeigen eine punktförmige CAP350 Lokalisation außerhalb, aber nahe am Zellkern, was auf eine centrosomale Lokalisation schließen lässt. Die Zelle am unteren Bildrand hat das Centrosom schon verdoppelt und befindet sich kurz vor dem Eintritt in die Mitose. CAP350 scheint in dieser Zelle sowohl am neu generierten als auch an dem ursprünglichen Centrosom vorzuliegen. Auch dies verdeutlicht die centrosomale Lokalisation von CAP350 in

Rattenlebergewebe. Ob es sich bei den dargestellten Zellen tatsächlich um Hepatocyten handelt, kann auf Grund der fehlenden Gewebestruktur in diesen Leber-Quetschpräparaten nicht genau bestimmt werden. Bei den dargestellten Zellen könnte es sich demnach auch um weitere in der Leber vorkommende Zelltypen, wie z.B. um Makrophagen oder um andere kernhaltige Blutzellen handeln. Da aber sehr viele Zellen dieser Quetschpräparate centrosomale CAP350 Lokalisation zeigen, scheint es wahrscheinlich, daß auch Hepatocyten CAP350 enthalten.

Eine weitere Immunfluoreszenzanalyse auf Rattenlungen-Gefrierschnitten zeigt, daß CAP350 auch in der Lunge centrosomal lokalisiert vorliegt (Abb. 27B), da jeweils ein CAP350 Signal an den Zellkernen der diversen Zellen auszumachen ist.

CAP350 scheint somit in allen menschlichen- bzw. Ratten Zelltypen exprimiert zu sein und hauptsächlich centrosomal vorzuliegen. Die Expression im Hoden in der Spermiogenese ist jedoch deutlich verstärkt, was für eine Beteiligung von CAP350 an der Reifung der Spermien spricht.

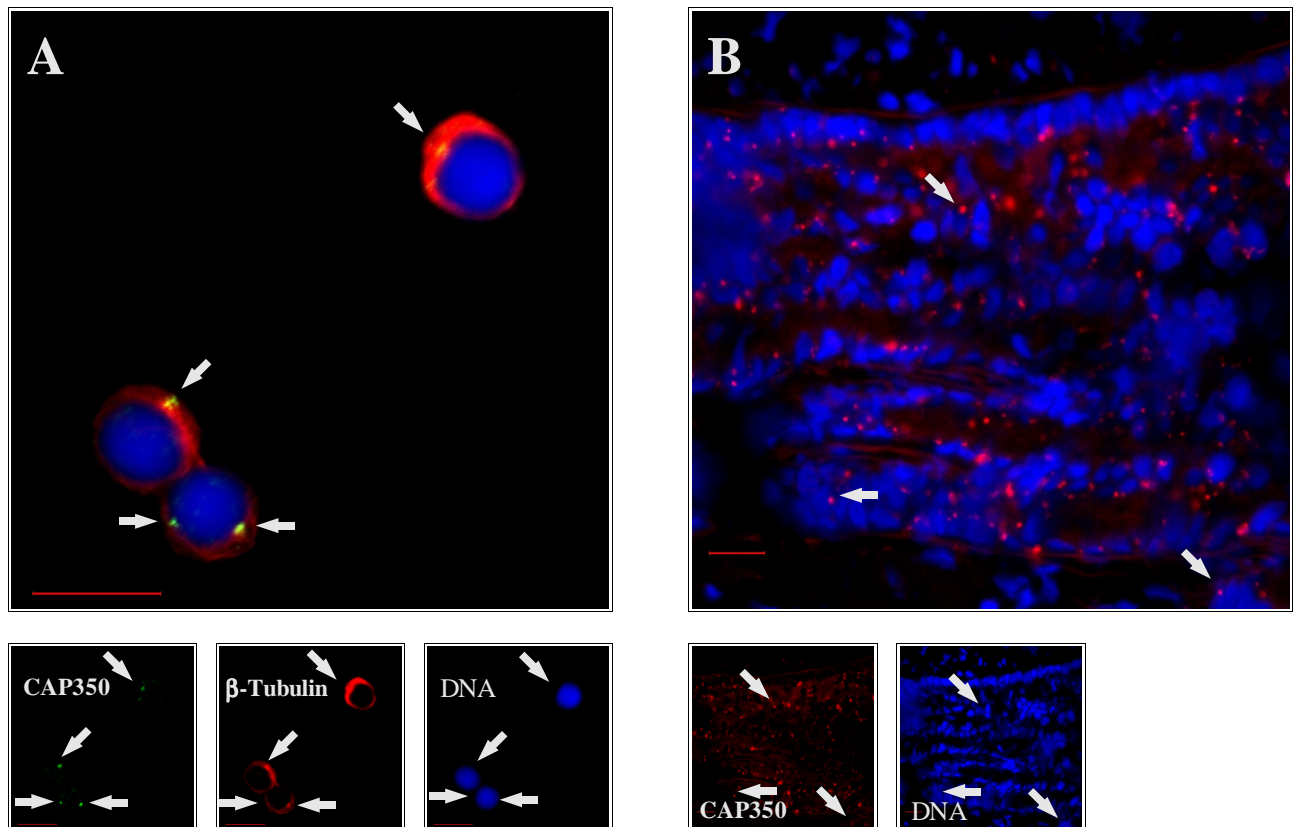


Abb. 27: Immunfluoreszenzanalysen auf Rattenleber- und Rattenlungengeweben

(A) Immunfluoreszenzaufnahme auf einem Rattenleberquerschnitt mit CAP350 Antikörpern (Ep76), nachgewiesen mit Alexa488 gekoppelten 2. Antikörpern (grün) und β-Tubulin Antikörpern, nachgewiesen mit Cy3 gekoppelten 2. Antikörpern (rot). Kernfärbung mit Hoechst 33342 (blau). Der Größenbalken ist 10 µm groß. Die Pfeile zeigen auf die jeweiligen Centrosomen. In den verkleinerten Abbildungen werden die einzelnen Immunfluoreszenzkanäle dargestellt.

(B) Immunfluoreszenzaufnahme auf einem Rattenlungen-Gefrierschnitt mit CAP350 Antikörpern (Ep76), nachgewiesen mit Cy3 gekoppelten 2. Antikörpern (rot). Kernfärbung mit Hoechst 33342 (blau). Die Pfeile zeigen beispielhaft auf mögliche centrosomale CAP350 Lokalisationen. Der Größenbalken ist 10 µm groß. In den verkleinerten Abbildungen werden die einzelnen Immunfluoreszenzkanäle dargestellt.

3.12 Die evolutionäre Konserviertheit des CAP350 Proteins

Um zu überprüfen, ob CAP350 so evolutionär konserviert ist, daß die gegen das Ratten CAP350 gerichteten Antikörper auch das *Xenopus* homologe CAP350 erkennen, wurden *Xenopus* Hodenquetschpräparate erstellt und diese mit dem CAP350 Antikörper Ep74 zusammen mit β -Tubulin Antikörpern in der Immunfluoreszenz untersucht (Abb. 28A).

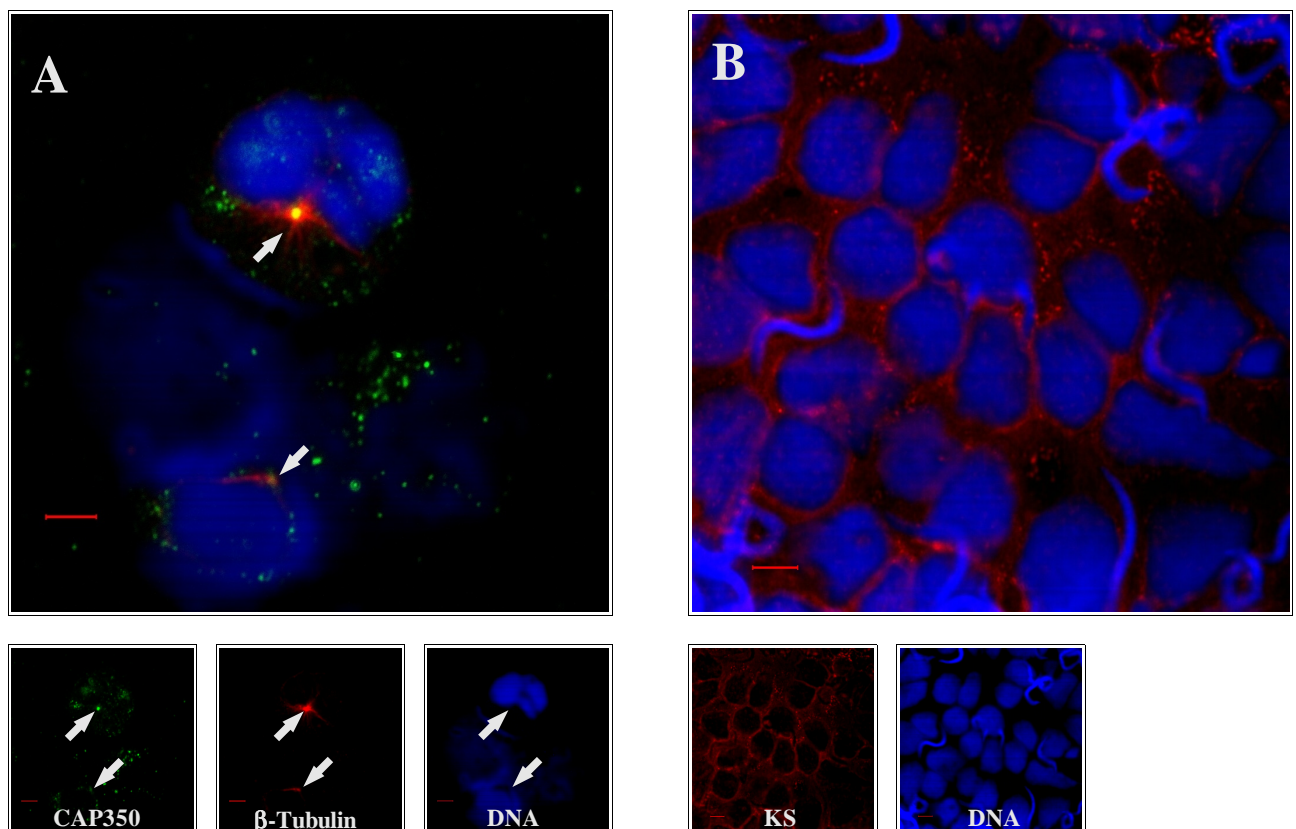


Abb. 28: Immunfluoreszenzanalysen auf *Xenopus* Hoden Quetschpräparaten

- (A)** Immunfluoreszenzanalyse auf einem *Xenopus* Hoden-Quetschpräparat mit CAP350 Antikörpern (Ep74), nachgewiesen mit Alexa488 gekoppelten 2. Antikörpern (grün) und β -Tubulin Antikörpern, nachgewiesen mit Cy3 gekoppelten 2. Antikörpern (rot). Kernfärbung mit Hoechst 33342 (blau). Der Größenbalken ist 5 μ m lang. Die Pfeile zeigen die Kolokalisation von CAP350 mit der Mikrotubuliaster. In den verkleinerten Abbildungen werden die einzelnen Immunfluoreszenzkanäle dargestellt.
- (B)** Immunfluoreszenzanalyse auf einem *Xenopus* Hoden-Quetschpräparat mit Kontrollserum (KS), nachgewiesen mit Cy3 gekoppelten 2. Antikörper (rot). Kernfärbung mit Hoechst 33342 (blau). Der Größenbalken ist 10 μ m lang. In den verkleinerten Abbildungen werden die einzelnen Immunfluoreszenzkanäle dargestellt.

Der gegen Ratten-CAP350 erzeugte Antikörper Ep74 zeigt auch in Xenopus-Hodenzellen das stärkste Signal am Centrosom, was durch die Kolo-kalisation mit der Mikrotubuli Aster, die durch den β -Tubulin Antikörper klar identifiziert werden kann, deutlich zu erkennen ist (Abb. 28A). Im Cytoplasma zeigt der CAP350 Antikörper zusätzlich noch einige punktförmige Signale, die möglicherweise unspezifischer Natur sind. Die Kontrollfärbung (Abb. 28B) zeigt keine vergleichbaren centrosomalen Signale. Vielmehr wird nur das Cytoplasma unspezifisch gefärbt. Die centrosomalen Signale des epitopgereinigten Ep74 Antikörpers scheinen demnach durch das Xenopus Homolog von CAP350 hervorgerufen zu werden. Der von dem Ep74 Antikörper erkannte CAP350 Bereich ist demnach so hoch zwischen Ratten und Xenopoden konserviert, daß der Ratten Antikörper das Xenopusprotein erkennen kann.

Die Übereinstimmung der centrosomalen Lokalisation von CAP350 in Xenopoden und höheren Organismen und die Konserviertheit des Proteins lassen auf eine essentielle Bedeutung von CAP350 schließen.

4 Diskussion

4.1 Der Kofaktor COPRA

4.1.1 Die Aufreinigung von COPRA

In in-vitro Transkriptionsreaktionen wurden die zellulären Transkriptionsverhältnisse nachgestellt und so die durch den PR vermittelte Transkriptionsaktivierung in-vitro analysiert. Hierzu wurde der PR als Histidin-Tag Fusionsprotein im Baculovirussystem überexprimiert und durch Ni-NTA chromatographisch gereinigt. Der rekombinante PR bewirkte in der zellfreien Transkription unter Zugabe des vollständigen Kernextraktes wie erwartet eine starke Aktivierung auf Templates, die PREs in der Promotorregion enthalten. Es zeigte sich jedoch, daß der rekombinant erstellte PR, wie auch schon Dr. Klotzbücher 1997 zeigen konnte, Progesteron unabhängig aktiviert (Abb. 1C). Ein Grund hierfür könnte das Fehlen von Chaperone-Proteinen, mit denen der PR in-vivo komplexiert vorliegt und die ihn so in einer inaktiven, aber Hormon aktivierbaren Form halten, an dem rekombinant erstellten PR sein (Pratt et al., 1988; Smith and Toft, 1993; Pratt, 1993; Bohen, 1995). Durch Verwendung partiell gereinigter und rekombinant erstellter Transkriptionsfaktoren gelang es, ein Transkriptionssystem aufzubauen, in dem der rekombinante PR nicht mehr die Transkription aktivieren kann (Abb. 2B, D). Durch Zugabe einer COPRA haltigen Fraktion konnte das bei in-vitro Transkriptionen im vollständigen Kernextrakt beobachtete Transaktivierungsverhalten des PR wieder erlangt werden. Eine COPRA enthaltende Fraktion konnte somit detektiert werden.

Über die von Dr. Klotzbücher entwickelte säulenchromatographische Anreicherung hinaus konnte COPRA in einem weiteren Schritt angereichert werden (Abb. 3A). Trotzdem ist die COPRA haltige Fraktion noch nicht so rein, daß die COPRA Aktivität mit einer Proteinbande auf einem SDS-Polyacrylamidgel korreliert. Somit war eine Peptidsequenzierung von COPRA im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Jedoch gelang es, den Koaktivator COPRA von einem auf der MonoQ Säule noch in denselben Fraktionen wie COPRA eluierenden Repressor klar zu trennen (Abb. 3B). Somit kann ausgeschlossen werden, daß dieser Repressor am Mechanismus der PR vermittelten Transaktivierung beteiligt ist.

Eine weitere Anreicherung von COPRA über herkömmliche säulenchromatographische Schritte war nicht möglich, wobei die Gründe hierfür vielfältig sein könnten. Der wahrscheinlichste Grund hierfür ist, daß die COPRA haltige Fraktion in den weiteren Aufreinigungsstufen zu verdünnt vorlag, um in der rekonstituierten in-vitro Transkription, die für den Nachweis von COPRA eingesetzt wurde, die PR abhängige Transaktivierung zu stimulieren. Eine höhere Konzentration

von COPRA könnte man vor allem durch eine Verwendung von mehr Ausgangsmaterial erreichen, was aber mit enormem Aufwand verbunden wäre. Da die COPRA Aktivität sowohl in der C Fraktion wie auch in der D Fraktion der Phosphocellulose P11 Säule nachweisbar ist, wären höhere Ausbeuten im ersten Fraktionierungsschritt durch eine Veränderung des Elutionsschemas möglich (Abb. 2).

Weiterhin besteht die Möglichkeit, daß es sich bei der COPRA Aktivität nicht um ein einzelnes Protein, sondern um einen Proteinkomplex handelt, der in den ersten säulenchromatographischen Schritten vielleicht auf Grund von Interaktionen der einzelnen COPRA Proteine untereinander oder auf Grund ähnlicher Eigenschaften in den gleichen Fraktionen eluiert. Diese COPRA Proteine könnten in der Gelfiltration oder auf der Hydroxylapatite Säule in unterschiedlichen Fraktionen eluieren, was eine Identifizierung der Aktivitäten in der in-vitro Transkription stark erschweren würde. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurden Versuche unternommen, in denen die eluierten Fraktionen gemischt und in der in-vitro Transkription eingesetzt wurden. Diese Mischexperimente führten jedoch nicht zur Rekonstitution der COPRA Aktivität, so daß diese Möglichkeit nicht bestätigt werden konnte (nicht gezeigt).

Da COPRA als Koaktivator für den PR wirkt (Klotzbücher et al., 1997), ist eine direkte oder indirekte Interaktion des Kofaktors mit dem PR nicht unwahrscheinlich. Eine affinitätschromatographische Reinigung von COPRA unter Verwendung des immobilisierten PR führte allerdings nicht zur funktionellen Depletion eines Rattenleber-Kernextraktes bzw. nicht zur Isolierung von COPRA. Eine stabile Interaktion zwischen COPRA und dem PR konnte somit nicht nachgewiesen werden (Abb. 4B). Dieses Ergebnis schließt eine transiente Interaktion, bei der COPRA kurzfristig mit dem PR interagiert, jedoch nicht aus. Diese kurzfristige Interaktion könnte für eine Konformationsänderung des PR ausreichen und so die von Dr. Klotzbücher (1997) postulierte intramolekulare Maskierung der AF1 und AF3 aufheben, bzw. einen an den PR gebundenen Repressor lösen und somit den PR aktivieren (Abb. 6A).

Da eine weitere Anreicherung von COPRA über herkömmliche säulenchromatographische Schritte nicht möglich war, wurde ein weiterer Affinitätsansatz zur Aufkonzentrierung von COPRA angewandt (Abb. 5A). Da von dem Kointegrator CBP bekannt ist, daß dieser Bestandteil diverser Proteinkomplexe ist, die allesamt Koaktivatoraktivitäten zeigen (Lee et al., 2001; Kim et al., 1999; Naar et al., 1998; Ko et al., 2000, Chen et al., 1997), wurde untersucht, ob COPRA mit CBP komplexiert vorliegt. Hierzu wurde Kernextrakt durch ein GST-SREBP-1a(As 1-50) Fusionsprotein, welches spezifisch mit CBP interagiert, an CBP Komplexen depletiert (Naar et al., 1998). Auf dem in Abb. 5B gezeigten SDS-Polyacrylamidgel erkennt man tatsächlich einige Proteine, die spezifisch mit den GST-SREBP-1a(As 1-50) Beads interagieren (vergleiche Spuren 3

und 4). Die Proteingrößen entsprechen in etwa den Proteinen, die von Naar et al., 1998 durch die SREBP-1a Interaktion mit CBP gefundenen wurden. Klar zu erkennen ist z.B. ein über 250 kD großes stark angereichertes Protein, bei dem es sich wahrscheinlich um CBP handelt. Der von Naar et al., 1998 beschriebene CBP Komplex scheint somit auch in den verwendeten Rattenleber-Kernextrakten mit SREBP-1a zu interagieren. Im depletierten Kernextrakt konnten jedoch in der in-vitro Transkription weder ein signifikant vermindertes PR Transaktivierungspotential noch ein verstärktes PR-vermitteltes Transaktivierungspotential durch die Zugabe des mit dem SREBP-1a-CBP Komplex interagierenden möglicherweise COPRA-haltigen Eluats festgestellt werden (Abb. 5C). Dies zeigt, daß COPRA unter diesen Bedingungen zumindest kein permanenter und stabiler Interaktionspartner der CBP-Komplexe ist und somit eine Anreicherung von COPRA über CBP Komplexe nicht möglich ist. Eine transiente oder schwache Interaktion von COPRA mit den CBP Komplexen kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

4.1.2 Wirkungsmechanismus von COPRA

Die von Dr. Klotzbücher postulierten COPRA Wirkungsmechanismen sind in Abb. 6A dargestellt. Wie von Dr. Klotzbücher gezeigt werden konnte, spielen C-terminal gelegene Repressions-Funktionen des PR eine entscheidende Rolle für die COPRA Aktivität, da eine Mutante, die am C-Terminus deletiert ist, keine COPRA-Abhängigkeit zeigt und auch ohne Zugabe von COPRA über die AF1 und AF3 aktiviert. Eine große Bedeutung für die Aktivierungsfähigkeit der AF2 kommt der molekülüberspannenden Helix 12 zu (Tanenbaum et al., 1998; Gong et al., 1997). Von der Helix 12 wird angenommen, daß diese in einem aktivierten PR sowohl mit dem Hormon als auch mit Koaktivatoren interagieren kann (Tanenbaum et al., 1998).

Um den Einfluß dieser Helix auf die Koaktivatorwirkung von COPRA zu untersuchen, wurde eine PR Mutante rekombinant erstellt, bei der die Ausbildung der Helix 12 durch eine Mutation an der Aminosäure 911 verhindert wurde. Eine Analyse dieser Mutante in der in-vitro Transkription zeigte sowohl die intramolekulare Inhibition der AF1 und AF3 bzw. die postulierte Repressorbindung in Abwesenheit von COPRA als auch die Aktivierung durch COPRA (Abb. 6B und C). Somit ist eine intakte Helix 12 für die Repression des PR und für die Aktivierung durch COPRA in-vitro auf „nackter“-DNA nicht essentiell. Da diese PR Mutante in-vivo jedoch nicht mehr aktivierungsfähig ist, scheint die Ausbildung der Helix 12 für die Interaktion mit Kofaktoren, die auf Chromatin

wirksam sind, notwendig.

Um den Mechanismus der Aktivierung des PR durch COPRA zu untersuchen und um die an der Aktivierung beteiligten PR Domänen genauer zu kartieren, wurden „squelching“-Experimente mit C-terminal bzw. N-terminal deletierten PR Mutanten durchgeführt.

Hierzu wurde die nicht mehr DNA bindende und somit nicht mehr transkriptionsaktivierende Deletionsmutante AB Δ core im Baculovirussystem rekombinant erstellt und in in-vitro Transkriptionsreaktionen eingesetzt (Abb. 7B). Sofern COPRA über die AB Domäne des PR interagieren würde, sollte der PR bei Zugabe einer steigenden Menge der AB Δ core Deletionsmutante immer weniger aktivieren können, da COPRA verstärkt mit der nicht aktivierenden AB Δ core Mutante interagieren sollte. Es zeigte sich jedoch, daß auch nach der Zugabe von hohen Konzentrationen der AB Δ core Deletionsmutante keine Beeinträchtigung der PR Aktivität feststellbar ist. Eine Interaktion von COPRA oder anderen eventuellen Kofaktoren über den N-Terminus kann somit nicht nachgewiesen werden.

Dies deckt sich mit früheren Ergebnissen, in denen Dr. Klotzbücher durch eine C-terminal deletierte Mutante, die COPRA unabhängig aktivierend wirkte, zeigen konnte, daß der C-Terminus des PR an der Aktivierung durch COPRA beteiligt ist (Klotzbücher et al., 1997).

Die N-terminalen Deletionsmutanten GST-DE und GST-D Δ E (Abb. 7A), die ebenfalls wegen der fehlenden DNA Bindedomäne nicht mehr transkriptionsaktivierend wirken, zeigten jedoch ebenfalls wie die AB Δ core Mutante keinen Einfluß auf die Aktivierung des PR (Abb. 7C). Dieses würde bedeuten, daß auch der C-terminale Bereich des PR nicht als Interaktionspartner mit COPRA oder anderen putativen Kofaktoren in Frage kommen würde. Es könnte aber auch bedeuten, daß nicht nur dieser C-terminale Anteil allein notwendig ist, sondern daß eine komplexe dreidimensionale Struktur, die von diesen Deletionskonstrukten nicht mehr ausgebildet werden kann, entscheidend ist.

Im Gegensatz zu der AB Δ core Deletionsmutante, die im Baculovirussystem erstellt worden ist, handelt es sich bei den beiden eingesetzten GST Fusionsproteinen um bakteriell überexprimierte Proteine. Bakteriell erstellte Proteine zeigen im Gegensatz zu den in Insektenzellen per Baculovirussystem exprimierten Proteinen eine geringere Übereinstimmung mit den in der Natur vorkommenden natürlichen Proteinen, da keine vergleichbaren post-translationalen Modifikationen wie in Säugetierzellen eingeführt werden. Möglicherweise spielen diese Modifikationen eine entscheidende Rolle für die Interaktion von COPRA mit dem PR. Dies würde bedeuten, daß für solche Analysen nach Möglichkeit das Deletionskonstrukt in einem eukaryotischen Expressionssystem erstellt werden sollte.

4.1.3 Der Einfluß von COPRA auf die Chromatintranskription

Bei der in-vitro Transkription auf „nackter“ DNA werden die Bedingungen im Zellkern im Reaktionsgefäß nur unzureichend nachgebildet, da das eingesetzte Reporterkonstrukt nicht wie die zelluläre DNA in Nukleosomen verpackt vorliegt. Durch die Verpackung in Chromatin hat DNA jedoch für die Transkriptionsmaschinerie und andere DNA bindende Faktoren andere Eigenschaften als unverpackte DNA, da chromatinverpackte DNA im allgemeinen wesentlich schlechter zugänglich ist. Die Regulation der Transkription erfolgt teilweise auch auf der Ebene des Chromatins (Wolffe et al., 1997). Hierbei spielt die sterische Zugänglichkeit des Chromatins für Proteine eine entscheidende Rolle. Diese Zugänglichkeit kann durch Chromatin modifizierende Proteine entscheidend beeinflusst werden. Hauptsächlich spielt hierbei die Acetylierung der Histone eine Rolle, wobei acetyliertes Chromatin im allgemeinen aufgelockert vorliegt und transkriptionsaktiv ist (Gorman et al., 1983; Lin et al., 1989; Bannister und Kouzorides, 1996).

Um zu überprüfen ob COPRA den PR auch auf chromatinverpackter DNA aktiviert, wurde die eingesetzte Plasmid DNA mit *Xenopus* Oocyten Extrakten in Chromatinstruktur verpackt und anschließend in der in-vitro Transkription oder in MNase Verdauen eingesetzt.

Um einen möglichen Einfluß des PR im Vergleich zu dem Einfluß des GAL4VP16 Fusionsproteins auf die Chromatinstruktur zu analysieren, wurden zu der Chromatin „assembly“-Reaktion auf einem PR- und Gal4-Bindestellen enthaltendem Plasmid die Transkriptionsaktivatoren zugegeben. In MNaseverdaureaktionen auf chromatinverpackter DNA zeigte sich, daß die Zugabe des PR im Gegensatz zu der Zugabe eines GAL4VP16 Fusionsproteins die Nukleosomenstruktur auch entfernt von den eigentlichen Bindestellen stark beeinflusst (Abb. 9). Dies könnte bedeuten, daß der PR entweder wesentlich unspezifischer DNA bindet als ein GAL4VP16 Fusionsprotein oder daß der Einfluß des PR auf die Nukleosomenstruktur wesentlich weiter als die von GAL4VP16 reicht. Da auch die Zugabe einer COPRA haltigen Fraktion zusammen mit dem PR die Nukleosomenstruktur nicht weiter verändert, scheint COPRA keine „nucleosome remodelling“ Aktivität zu enthalten.

Auf chromatinverpackter DNA ist die basale Transkription kaum detektierbar (Abb. 8C, 10). Erst die Zugabe von Aktivatoren stimuliert die Transkription dermaßen, daß Transkripte nachweisbar sind. Die durch den PR vermittelte Transaktivierung kann dabei durch die zusätzliche Zugabe einer COPRA enthaltenden Fraktion nochmals um ca. den Faktor 2 aktiviert werden (Abb. 10, vergl. Spuren 4 und 5). Die COPRA enthaltende Fraktion stimuliert jedoch auch ohne Zugabe des PR die basale Transkription leicht (Abb. 10, Spur 6). Dieser Effekt war auf nackter DNA nicht zu erkennen (Abb. 2B,D). Daher enthält die eingesetzte COPRA haltige Fraktion möglicherweise einen allgemeinen spezifisch auf Chromatin wirkenden Aktivator. Da die COPRA Fraktion in

MNaseverdaustudien jedoch keine „remodelling“-Aktivitäten zeigt (Abb. 9), muß die Chromatin abhängige Wirkung dieses Aktivators über andere Mechanismen laufen. Ob die Aktivierung der PR vermittelten Transkription auf Chromatin nach der Zugabe einer COPRA haltigen Fraktion durch die eigentliche COPRA Wirkung oder durch einen in der COPRA Fraktion enthaltenen postulierten zusätzlichen Aktivator bewirkt wird, kann nicht klar bestimmt werden.

Die Chromatintranskriptionsanalysen wurden nicht im rekonstituierten System, sondern unter Zugabe eines Kernextraktes durchgeführt. Bei in-vitro Transkriptionsreaktionen auf „nackter“ DNA stimuliert die exogene Zugabe von COPRA die PR vermittelte Transkriptionsaktivierung nicht weiter (nicht gezeigt). COPRA liegt also für die Transkription auf „nackter“ DNA in sättigenden Mengen im Kernextrakt vor. Sofern die leichte Stimulierung der PR vermittelten Transaktivierung auf Chromatin von COPRA und nicht von dem Vorhandensein eines weiteren Chromatin wirksamen Faktors abhängt, könnte COPRA für die Transkription auf chromatinverpackter DNA in nicht sättigenden Konzentrationen vorliegen. Eine nicht sättigende COPRA Konzentration könnte bedeuten, daß die Regulation Progesteron-abhängiger Gene auch durch die Konzentration von COPRA gesteuert werden könnte.

4.1.4 Die weitere Analyse der PR Aktivierung durch COPRA

COPRA konnte durch säulenchromatographische Methoden zwar stark angereichert werden, eine Proteinsequenzierung ist in der bisherigen Aufreinigungsstufe jedoch nicht möglich. Eine erneute säulenchromatographische Aufreinigung sollte zum einen von mehr Kernextrakt als Ausgangsmaterial ausgehen und zum anderen sollten die P11 Fraktionen C und D gemeinsam für die weitere Anreicherung von COPRA verwendet werden. So könnte die Ausbeute an COPRA verbessert werden. Eventuell wäre es so dann möglich, COPRA so hoch anzureichern, daß eine Protein-Sequenzierung durchführbar ist. Im Anschluß an die Proteinsequenzierung müßte durch die Verwendung von degenerierten Primern die Bestimmung der DNA-Sequenz von COPRA möglich sein.

Durch weitere PR Deletionsmutanten, die nach Möglichkeit in einem eukaryotischen Expressionssystem erstellt werden sollten, könnten die für die COPRA Wirkung notwendigen Bereiche des PR weiter eingengt werden. Hierzu könnten neben direkten COPRA Aktivierungsexperimenten im rekonstituierten in-vitro Transkriptionssystem auch „squelching“-Experimente Aufschluß geben.

Durch die Verwendung von höher angereichertem oder von rekombinant erstelltem COPRA könnte die aktivierende Wirkung auf die PR vermittelte Transaktivierung im Chromatinumfeld ohne das Vorhandensein weiterer auf Chromatin wirksame Transkriptionsaktivatoren analysiert werden.

4.2 Das centrosomal-assoziierte Protein von 350 kD Größe (CAP350)

4.2.1 Die CAP350 DNA- und Proteinsequenz

Ein interner Bereich der CAP350 cDNA wurde ursprünglich von Dr. Schwerk in einem Hefe-“two-hybrid“ Screen als hormonabhängiger Interaktionspartner des PR gefunden. Bezeichnet wurde diese Sequenz zunächst als 114-2. Dr. Michels konnte die cDNA Sequenz des 114-2 Gens sowohl in 5'- als auch in 3'-Richtung verlängern, wobei er im 5'-Bereich den Translationsstartpunkt identifizieren konnte. Dr. Michels nahm damals an, daß er die vollständige Aminosäuresequenz des 114-2 Proteins gefunden hätte. Es zeigte sich allerdings im 3'-untranslatierten Bereich der 114-2 cDNA Sequenz eine perfekte Homologie zu der kodierenden Sequenz des Proteins KIAA0480. Durch Sequenzierungsfehler nahm er jedoch an, daß der 114-2 Bereich durch mehrere Stopcodons in allen Leserahmen von der KIAA0480 Sequenz getrennt wäre und somit die 114-2 und die KIAA0480 Sequenz für eigenständige Proteine kodieren würden. So postulierte er, daß das 114-2 Transkript zusammen mit dem KIAA0480 Transkript eine bicystronische RNA, also eine RNA mit 2 kodierenden Sequenzen, darstellen könnte.

Der Übergangsbereich von der von Dr. Michels postulierten 114-2 Sequenz in die KIAA0480 Sequenz wird inzwischen jedoch durch einen weiteren cDNA Klon (KAIA2443) abgedeckt, der zeigt, daß 114-2 nicht wie vermutet von der KIAA0480 Sequenz durch Stop Codons in allen Leserastern getrennt ist, sondern daß die KIAA0480 Sequenz zu der 114-2 Sequenz gehört (Abb. 11 und Tabelle 1). Zusätzlich zu der überlappenden cDNA Sequenz wurde die CAP350 Sequenz mit einer im Rahmen des „human genome project“ erstellten Datenbank verglichen. Auch in dieser genomischen Datenbank findet man überlappende Sequenzen von 114-2 und KIAA0480, wobei der Klon unter der Datenbanknummer NT_004591.1 den cDNA Bereich des 114.2 Übergangs zu KIAA0480 ab dem Nukleotid 4791 abdeckt (Tabelle 1). Der Übergang der ursprünglichen 114-2 Sequenz in die KIAA0480 Sequenz wurde zusätzlich durch eine RT-PCR Reaktion mit anschließender Sequenzierung auf Ratten RNA (Abb. 21) und durch Sequenzierung von humanen Klonen (L. Klein-Hitpass, unveröffentlicht) überprüft. Auch hier wurde festgestellt, daß die kodierende cDNA Sequenz von 114-2 in den KIAA0480 Bereich übergeht.

Auf Proteinebene konnte durch die Größe des im Westernblot nachgewiesenen Proteins ebenfalls bewiesen werden, daß die 114-2 und die KIAA0480 Sequenz nicht für unterschiedliche Proteine, sondern für ein Protein kodieren, da das von Dr. Michels postulierte 114-2 Protein eine Größe von 194,7 kD hätte, die affinitätsgereinigten Antikörper jedoch ein Protein von ca. 350 kD Größe zeigen

(Abb. 16 A und B). Dies entspricht der Größe eines Proteins, welches die 114-2 und die KIAA0480 Sequenz umfaßt.

Außerdem erkennen die drei CAP350 Antikörper, von denen zwei gegen den postulierten 114-2 Anteil und einer gegen den KIAA0480 Anteil von CAP350 gerichtet sind, in der Immunfluoreszenzanalyse auf Zellkulturzellen und auf Gewebezellen jeweils ein centrosomal lokalisiertes Protein, was klar darauf hindeutet, daß alle drei Antikörper tatsächlich ein und dasselbe Protein nachweisen (Abb. 12 A-C). All diese Punkte verdeutlichen, daß die KIAA0480 Sequenz und die als 114-2 bezeichnete Sequenz nicht für eigenständige Proteine kodieren, sondern beide Teile der CAP350 cDNA sind.

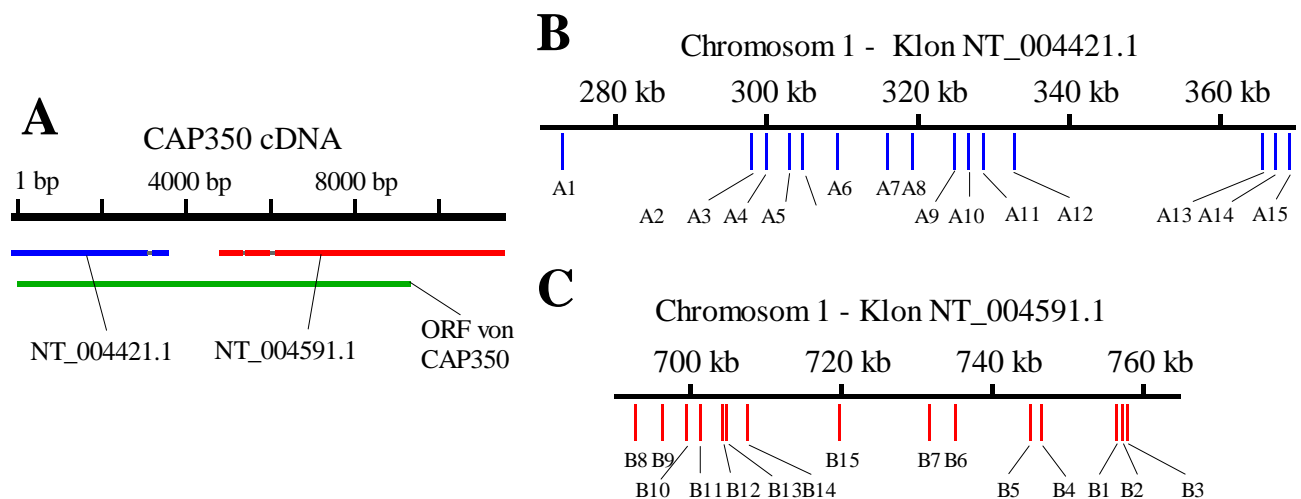


Abb. 29: Schematische Darstellung der genomischen Exon Struktur des CAP350 Gens

(A) Schematische Darstellung der CAP350 cDNA mit angegebenen Größenstandards (schwarz). Die Numerierung der Nukleotidsequenz beginnt mit dem Adenin des Startcodons, der 5'-untranslatierte Bereich wurde darauf bezogen mit negativen Zahlenwerten versehen. Die relative Lage der genomischen Datenbankklone NT_004421.1 (blau) und NT_004591.1 (rot) zu der cDNA von CAP350 ist angegeben. Der „open reading Frame“ (ORF) von CAP350 ist in grün dargestellt.

(B+C) Schematische Darstellung der genomischen „contigs“ von CAP350 (blau bzw. rot) auf dem Chromosom 1 mit angegebenen Größenstandards (schwarz). In (B) sind die CAP350- „contigs“ des Klons NT_004421.1 (A1 - A15, blau) und in (C) die CAP350-„contigs“ des Klons NT_004591.1 (B1 - B15, rot) angegeben. Die Numerierungen der „contigs“ bezieht sich auf die 5'-3' Lage der „contigs“ auf der CAP350 cDNA.

Durch den Vergleich der CAP350 cDNA Sequenz mit einer genomischen Datenbank konnte außerdem die Lokalisation auf dem Chromosom 1 nachgewiesen und die Intron-Exon Struktur zum großen Teil bestimmt werden (Tab. 1, Abb. 29B,C). Die Sortierung der genomischen CAP350 Klone ist bisher jedoch noch nicht vollständig abgeschlossen, so daß die in Abb. 29 B und C dargestellte Exon Struktur nur eine vorläufige genomische Struktur von CAP350 wiedergibt. Die zum jetzigen Zeitpunkt analysierte genomische Sequenz von CAP350 umfaßt den Großteil der cDNA Bereiche von -167 bis 3551 bp und 4791 bis 11573 bp. In dem bisher sequenzierten CAP350 Anteil konnten so 30 „contigs“ lokalisiert werden, die sich auf genomischer Ebene nach den bisherigen Sortierungen der Klone über mehr als 400 kb auf dem Chromosom erstrecken. Da der interne Bereich der CAP350 cDNA bisher nicht in den sequenzierten genomischen Klonen enthalten ist und da die genomischen Klone einige kleinere Bereiche der CAP350 cDNA nicht enthalten, bedeutet dies, daß die genomische CAP350 DNA-Sequenz mindestens 31 Exons, wahrscheinlich jedoch mehr, aufweist. Eine solch große Anzahl von Exons läßt vermuten, daß es „splice“-Varianten von CAP350 geben kann. In der Tat scheint der cDNA Klon KAIA2443 eine „splice“-Variante von CAP350 zu sein, da dieser Klon 5'- und 3'-homologe Bereiche zu CAP350 aufweist, intern jedoch 2230 Nukleotide der CAP350 Sequenz nicht enthält (Abb. 11 und Tabelle 1). Allerdings zeigt die Westernblotanalyse auf centrosomalem Material, neben kleineren nicht deutlich abgegrenzten Signalen, nur eine klare Proteinbande bei ca. 350 kD, was eher gegen „splice“-Varianten spricht (Abb. 16B). Bei den kleineren, nicht klar abgegrenzten Signalen könnte es sich jedoch um eine große Vielzahl von unterschiedlichen „splice“-Varianten handeln; wahrscheinlicher ist aber, daß diese Signale hauptsächlich durch Proteinabbau hervorgerufen werden. Da allerdings das Trennvermögen eines SDS-Polyacrylamidgels bei Proteinen dieser Größe nur gering ist, können kleine Größenunterschiede zu der Proteinbande bei ca. 350 kD durch unterschiedliche „splice“-Varianten nicht erkannt werden. Außerdem würde eine „splice“-Variante, die den vom CAP350 Antikörper erkannten Bereich nicht enthält, nicht identifiziert werden. Eine genaue Identifizierung und Charakterisierung von „splice“-Varianten wäre durch die Verwendung von Sonden, die in unterschiedlichen CAP350 Bereichen hybridisieren, in Northernblotanalysen möglich.

Auf RNA Ebene konnte das CAP350 Transkript im Northernblot in Ratten-Hoden als Doppelbande nachgewiesen werden, wobei das kleinere Transkript das prominentere ist (Abb. 23C). Die Größe der Transkripte beträgt ca. 13 und 10 KB. Ebenfalls konnte auf Leber- und Darmgewebe sehr schwache Transkriptsignale nachgewiesen werden. Auch Dr. Schwerk konnte bei seinen Untersuchungen eine differenzielle Expression von der damals noch 114-2 genannten RNA in humanen Geweben feststellen. So konnte er in Hoden ein ca. 10 kb großes Haupttranskript und zwei weitere RNAs einer Länge von ca. 9 kb und ca. 7 KB nachweisen, während er in Milz, Thymus, Prostata, Eierstock, Dünndarm und Dickdarm jedoch nur ein schwaches 10 kb Signal detektieren konnte. Der Nachweis jeweils mehrerer Transkriptgrößen sowohl auf Ratten-, wie auch auf humanen Geweben könnte entweder auf unterschiedliche Polyadenylierungsstellen, auf alternative Promotoren oder auch auf unterschiedliche „splice“-Varianten schließen lassen. Daß Dr. Schwerk in seinen Untersuchungen etwas andere Transkriptgrößen nachweisen konnte als ich in meinen Analysen, liegt an der Verwendung von humanen RNAs durch Dr. Schwerk und der Verwendung von Ratten RNAs in meinen Untersuchungen oder an der Verwendung unterschiedlicher Größenstandards.

```

CAP350 (human):          GETSFAKGFWAGVELDKPEGNNGTYDGIAYFECK-EKHGIF
NI80 (Hefe):             GETQFAKGFWYGVELDKPLGKNDGTYDGIRYFDCD-LKHGNFNGGYYGL
Restin(Domäne 2)(human): GETDFAKGEWCGVELDEPLGKNDGAVAGTRYFQCP-PKYGLF.....
Restin(Domäne 2)(Huhn):  GETDFAKGEWCGVELDEPLGKNDGAVAGTRYFQCQ-PRYGLF.....
Restin(Domäne 1)(human): GETQFAPGQWAGVVLDDPVGKNDGCVGGVRYFQCP-PLRGIFTR.....
Restin(Domäne 1)(Huhn):  GETQFAPGQWAGIVLDEPIGKNDGSVAGVRYFQCE-PLRGIFTR.....
Dynactin (human):       GETAFAPGTWVGIELDEPSGKNDGSVQGERYFNCE-MGYGMFVR.....
Dynactin (Ratte):       GATLFATGKWVGVILDEAKGKNDGTVQGRKYFTCD-EGHGIFVR.....
Dynactin (Drosophila):  GDDQLRVGKWVGVVLDEPKGKNSGSIKQQYFQCD-ENCGMFVR.....
CKAPI (human):          GLTDFKPGYWIGVRYDEPLGKNDGSVNGKRYFECQ-AKYGAFVK.....
CAP-Gly Konsensus:      GETQFAPGMWVGVVELDEPTGKNDGSVQGVRYFQCEHPKHGIFVRGYYGL

```

Abb. 30: Sequenzvergleich unterschiedlicher CAP-Gly Domänen

Dargestellt sind die Proteinsequenzen der CAP-Gly (cytoskeleton-associated protein glycine rich) Domänen aus unterschiedlichen Proteinen. Die Namen der Proteine und die Spezies sind jeweils angegeben. In rot und blau sind die Übereinstimmungen mit den Konsensusamino-säuren der CAP-Gly Domäne dargestellt. Die variablen Aminosäuren sind schwarz markiert. Die in der Literatur beschriebene Konsensussequenz ist angegeben. Sortiert sind die Sequenzen nach der Verwandtschaft zur CAP350 CAP-Gly Domäne.

4.2.2 Die Analyse der bedeutenden CAP350 Struktur motive

Die Aminosäuresequenz von CAP350 zeigt einige Übereinstimmungen mit bekannten Proteinmotiven (Tabelle 2). Auffallend ist hier vor allem die hoch konservierte CAP-Gly Domäne, die sich über die Aminosäuren 2517 bis 2548 erstreckt (Abb. 30 und Anhang 1). Die CAP-Gly Domäne ist eine Glycin reiche Domäne von knapp über 40 Aminosäuren Länge, die in einigen cytoskelettal assoziierten Proteinen, wie z.B. in Restin, welches 2 CAP-Gly Domänen enthält, in dem Hefe Protein NI80, in Dynactin und in CKAPI (cytoskeleton-associated protein I, glycine motif) enthalten ist (Abb. 30). Die Konsensussequenz der CAP-Gly Domäne und die Lage der konservierten Glycine kann der Abbildung 30 entnommen werden. Die genaue Funktion dieser Domäne ist nicht bekannt, jedoch läßt das Vorhandensein dieser Domäne in diversen cytoskelettal-assozierten Proteinen auf eine konservierte Funktion der CAP-Gly Domäne schließen (Riehemann and Sorg, 1993). Vermutet wird jedoch eine Beteiligung der CAP-Gly Domäne an der Bindung an die Mikrotubuli (Watanabe et al., 1996). Viele dieser Proteine, wie z.B. auch Restin, Dynactin oder NI80, enthalten neben der N-terminal gelegenen CAP-Gly Domäne, C-terminal zu dieser Domäne mehrere „Coiled-coil“-Motive. Da die CAP-Gly Domäne von CAP350 im C-terminalen Anteil zu finden ist und da der Großteil der „Coiled-coil“-Motive N-terminal zu der CAP-Gly Domäne liegen (Abb. 19A), unterscheidet sich der Aufbau von CAP350 deutlich von anderen CAP-Gly haltigen Proteinen, was möglicherweise auf eine andere Funktion der CAP-Gly Domäne hinweisen könnte. Die Sequenz der CAP350 CAP-Gly Domäne zeigt die größten Sequenzübereinstimmungen mit der CAP-Gly Domäne des Hefe Proteins NI80, welches bisher nicht weiter charakterisiert wurde. Nah verwandt sind auch die CAP-Gly Domänen von Restin und CAP350 untereinander, wohingegen sich die CAP-Gly Domänen von Dynactin und CAP350 stärker unterscheiden und somit entwicklungsgeschichtlich wahrscheinlich weiter voneinander entfernt sind (Abb. 30).

CAP350 kolokalisiert zumindest während der Zellteilung klar mit den Mikrotubuli (Abb. 14,19C). In Interphasenzellen ist die Mikrotubuliinteraktion nicht so klar auszumachen wie in den mitotischen Zellen, jedoch gibt es ebenfalls einige Hinweise auf eine Kolokalisation (Abb. 18D). Weiterhin erkennt man in Überexpressionsstudien des Vollängenkonstruktes in der Interphase häufig eine netzwerkartige Lokalisation (Abb. 18F, 19B). Bei genauer Betrachtung der Immunfluoreszenzbilder wird jedoch nicht ganz klar, ob es sich um Kolokalisation oder um Lokalisation direkt neben den Mikrotubuli handelt (Abb. 18D,F). Eine Kolokalisation würde für

eine direkte Interaktion mit den Mikrotubuli sprechen, wohingegen eine Lokalisation direkt neben den Mikrotubuli wohl eher auf eine Beteiligung an Mikrotubuli assoziierten Komplexen schließen ließe. In Überexpressionsstudien einer die CAP-Gly Domäne enthaltenden CAP350 Deletionsmutante ist zum einen keine centrosomale Lokalisation und zum anderen kaum noch cytoskelettal, netzwerkartige Färbung nachweisbar (Abb. 19J). Netzwerkartige Strukturen und centrosomale Assoziationen zeigen dagegen in Überexpressionsstudien nur Deletionsmutanten, die noch N-terminalen Bereich von CAP350 umfassen. Eine direkte Rolle der CAP-Gly Domäne für die cytoskelettale-Assoziation von CAP350 kann somit nicht festgestellt werden.

Ebenso wie viele weitere centrosomale Proteine, wie z.B. Pericentrin (Dictenberg et al., 1998; Doxsey et al., 1994), AKAP450 (Schmidt et al., 1999; Takahashi et al., 1999; Witczak et al., 1999) oder Kendrin (Flory et al., 2000), enthält CAP350 mehrere „Coiled-coil“-Motive (Tabelle 2). Das Vorhandensein mehrerer dieser Proteinmotive paßt somit gut zu der durch Immunfluoreszenzanalysen nachgewiesenen centrosomalen Lokalisation von CAP350. Welche Funktion die „Coiled-coil“-Motive in diesen centrosomalen Proteinen ausüben, ist nicht genau bekannt. Jedoch weiß man, daß über diese „Coiled-coil“-Motive eine Dimerisation oder sogar eine Polymerisation von Proteinen möglich ist (Harborth et al., 1999). Die am C-Terminus deletierten CAP350 Deletionskonstrukte zeigten in Überexpressionsstudien centrosomale Lokalisation, wohingegen die am N-Terminus deletierte Mutante keine centrosomale Lokalisation mehr zeigte (Abb. 19 D-J). Die am N-Terminus deletierte Mutante CAP350(As 1896-3117) enthält noch mindestens 2 „Coiled-coil“ Motive, zeigt jedoch trotzdem keine centrosomale Lokalisation (Abb. 19J). Somit ist das alleinige Vorhandensein dieser Struktur motive nicht ausreichend für die centrosomale Lokalisation. Möglicherweise werden mehrere Proteinmotive zusammen für die centrosomale Lokalisation benötigt, wobei die „Coiled-coil“ Motive eine Rolle spielen könnten. Die stark am C-Terminus verkürzte Mutante CAP350(As 1-983) zeigt noch Lokalisation am Centrosom (Abb. 19G und H). Diese Mutante umfaßt jedoch noch zwei „Coiled-coil“ Motive. Möglicherweise sind genau diese beiden „Coiled-coil“ Domänen für die centrosomale Lokalisation notwendig, was durch Überexpressionsstudien mit Mutanten, bei denen diese „Coiled-coil“-Domänen zerstört wurden, analysiert werden könnte. Da allerdings auch die interne Deletionsmutante CAP350(As 1427-1923), die diese beiden N-terminal gelegenen und für die centrosomale Lokalisation möglicherweise mit entscheidenden „Coiled-coil“-Motive nicht enthält, in mitotischen Zellen noch eine schwache Kolokalisation mit dem Centrosom zeigt (Abb. 19 I), scheinen auch für die centrosomale Lokalisation mehrere N-terminale Proteindomänen entscheidend zu sein.

Obwohl CAP350 sieben Kernlokalisationssignale (NLS), wobei vier als „bipartite“ Kernlokalisationssignale vorliegen, enthält (Tabelle 2), liegt es größtenteils cytoplasmatisch gebunden am Centrosom vor. NLS Signale sind in diversen anderen Proteinen sehr effektiv, da häufig schon ein einziges Signal für den Transport in den Zellkern ausreicht. Die sieben NLS Signale von CAP350 sollten demnach für einen schnellen Transport in den Zellkern sorgen. Da dies offensichtlich nicht der Fall ist, müssen andere Protein-Eigenschaften von CAP350 diesen Transport verhindern. Möglicherweise ist die Assoziation am Centrosom oder an den Mikrotubuli so stark, daß es nicht zu dem Transport in den Zellkern kommt. Weiterhin wäre denkbar, daß CAP350 zwar in den Kern transportiert wird, jedoch ebenfalls aktiv gleichzeitig aus dem Kern heraus transportiert würde. Hierzu wären Experimente mit dem Kernexport-Inhibitor Leptomycin B interessant, da so getestet werden könnte, ob CAP350 ohne den Transport aus dem Kern heraus kernlokalisiert vorliegt (Wolff et al., 1997).

Überexpressionsstudien des Vollängen CAP350 Proteins (Abb. 18F und 19B,C) zeigen häufig, neben einer verstärkten centrosomalen Lokalisation, große punktuelle oder faserartige Anlagerungen von CAP350 direkt am Zellkern. In nicht transfizierten HeLa Zellen kann eine vergleichbare CAP350 Lokalisation in geringem Maße ebenfalls direkt am Zellkern detektiert werden (Abb. 17A,B und Abb. 18D). Obwohl CAP350 demnach auch in der direkten Nachbarschaft des Zellkerns nicht centrosomal gebunden vorliegt, scheint der Transport in den Zellkern nicht stattzufinden. Möglicherweise wird nicht centrosomal gebundenes CAP350 durch die Interaktion mit anderen Faktoren am Transport in den Kern gehindert. Mögliche Interaktionspartner wären vor allem die Mikrotubuli, von denen ja eine Interaktion mit CAP350 vermutet wird, oder Proteine der Kernmembran. Eventuell interagieren CAP350 Moleküle auch untereinander und bilden so große polymere Strukturen, die auf Grund der Größe eventuell nicht mehr in den Kern transportiert werden könnten.

4.2.3 Die Interaktion von CAP350 mit dem PR

Dr. Schwerk isolierte einen Teil der CAP350 cDNA bei der Suche nach hormonabhängigen Interaktionspartnern des PR auf einer HeLa cDNA Bank mit einem Hefe-„two-hybrid“ System. Die gefundene CAP350 Sequenz kodierte für ein Protein, welches im Hefe-„two-hybrid“ System eindeutig agonistabhängig mit dem carboxyterminalen Teil des PR reagiert. Sowohl die Northernblotanalysen von Dr. Schwerk, als auch die Northernblotanalysen und RT-PCR

Reaktionen, die im Laufe der Anfertigung dieser Arbeit erstellt wurden, zeigen, daß CAP350 relativ stark im Hoden exprimiert wird (Abb. 23A,C). Die starke Expression von CAP350 in einem reproduktiven Organ kann als Hinweis bewertet werden, daß CAP350 möglicherweise an einer Funktion mit den Steroidhormonrezeptoren beteiligt sein könnte.

In Zellkulturzellen, die die B-Form des PR stabil exprimieren, wurden Lokalisationsstudien von CAP350 mit und ohne Zugabe des synthetischen Hormons R5020 durchgeführt (Abb. 17). Sofern es in-vivo zu hormonabhängigen Interaktionen des PR mit CAP350 kommt, sollte nach Zugabe von Hormon eine Kolokalisation der beiden Proteine nachweisbar sein. Da CAP350 jedoch in Zellen, die keinen PR exprimieren, genauso centrosomal lokalisiert vorliegt wie in Zellen, die den PR exprimieren, und da die Zugabe des synthetischen Hormons R5020 zu diesen PR positiven Zellen keinen Einfluß auf die centrosomale Lokalisation von CAP350 hat und der PR nach der Zugabe von R5020 im Zellkern vorliegt, kommt es zu keiner nachweisbaren Kolokalisation von CAP350 mit dem PR. Eine Interaktion kann somit auf diese Weise nicht nachgewiesen werden. Allerdings wird der PR, wie jedes Protein, im Cytoplasma durch die Translationsmaschinerie erstellt und erst anschließend in den Zellkern transportiert. Eine Interaktion zwischen dem PR und CAP350 könnte so im Rahmen des Transportes des PR in den Zellkern stattfinden. Ob CAP350 an einem aktiven Transport des PR in den Zellkern beteiligt ist, kann durch diese Analysen nicht aufgeklärt werden. Von dem Tumorsuppressor p53, der ebenfalls wie der PR als Transkriptionsfaktor im Zellkern wirkt, ist jedoch bekannt, daß er nach DNA-Schädigung spezifisch über den Dynein Motor an den Mikrotubuli entlang vom Cytoplasma in den Zellkern transportiert wird (Giannakakou et al., 2000). CAP350 könnte an ähnlichen Transportkomplexen beteiligt sein, wozu die Lokalisation an den Mikrotubuli passen würde. Außerdem ist gerade CLIP-170, das bis auf 35 fehlende Aminosäuren identisch mit Restin ist, an der Bindung von Dynactin an die Mikrotubuli und somit am Proteintransport beteiligt (Griparic et al., 1998; Valetti et al., 1999; Vaughan et al., 1999). Da Restin zwei CAP-Gly Domänen enthält und da CAP350 eine sehr nah mit der CAP-Gly Domäne von Restin verwandte CAP-Gly Domäne enthält, ist eine zumindest teilweise ähnliche Funktion dieser beiden Proteine möglich. CAP350 könnte somit an Transportmechanismen beteiligt sein. Im Rahmen dieses Transportes könnte es trotz der normalerweise unterschiedlichen zellulären Lokalisationen des PR und CAP350 zu der in dem Hefe-„two-Hybrid“ System gefundenen Interaktion zwischen dem PR und CAP350 kommen.

Um eine mögliche Interaktion von CAP350 und dem PR zu analysieren, wurden auch Immunpräzipitationsanalysen durchgeführt. Es konnte jedoch weder eine spezifische Interaktion des PR mit dem Vollängen CAP350 noch mit dem N-terminalen CAP350(As 1-1923), das die im Hefe-„two-Hybrid“ System gefundene Interaktionsdomäne umfaßt, gefunden werden (nicht gezeigt).

Dr. Michels versuchte ebenfalls, Interaktionen des PR mit CAP350, bzw. Interaktionen des PR mit dem N-terminalen CAP350 Anteil 114-2 zu analysieren. Hierzu bediente er sich zum einen der Gelretardationsanalyse und zum anderen der GST-Fusionsprotein-Interaktionsanalyse. Auch mit diesen Ansätzen gelang es jedoch nicht, die hormonabhängige Interaktion des PR mit CAP350 aus dem Hefe „two-Hybrid“-System zu bestätigen.

Wenngleich vieles daraufhin deutet, daß die in der Hefe gefundene Interaktion in eukaryotischen Zellen nicht stattfindet, so kann eine Interaktion zum gegenwärtigen Zeitpunkt auch nicht völlig ausgeschlossen werden, da der fehlende Nachweis auf zu geringe Empfindlichkeiten der eingesetzten Methoden, auf die Verwendung bakterieller Proteine und auf die begrenzte Extrahierbarkeit von CAP350 zurückzuführen sein könnte.

4.2.4 Die Expression und möglich Funktion von CAP350

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Northernblot- und RT-PCR Analysen auf Zellen- und Rattengewebe RNA zeigen, daß CAP350 nicht in allen Geweben gleichmäßig, sondern verstärkt im Hoden exprimiert wird (Abb. 23A und C). Transkripte auf Darm und Leber RNA sind jedoch ebenfalls schwach im Northernblot nachweisbar. Dr. Schwerk konnte in seinen Untersuchungen ebenfalls eine differentielle Expression mit einer verstärkten Expression im Hoden feststellen. Weiterhin konnte er Transkripte schwach in Milz, Thymus, Prostata, Eierstock, Dünndarm, Dickdarm, Leukozyten, Gehirn, Gebärmutter, Skelettmuskel und Bauchspeicheldrüsen RNA nachweisen. CAP350 Transkripte konnte er jedoch nicht in Lunge, Leber und Niere nachweisen. Da im Gegensatz zu den Untersuchungen von Dr. Schwerk CAP350 Transkripte in der Leber schwach nachweisbar sind (Abb. 23C) und da auf Proteinebene CAP350 auch in der Lunge und Leber nachweisbar ist (Abb. 27A und B), scheint CAP350 in allen bisher untersuchten Zellen exprimiert und somit wahrscheinlich ubiquitär vorzuliegen. Ein ubiquitäres Vorhandensein von CAP350 läßt auf eine für die Zelle essentielle Bedeutung von CAP350 schließen. CAP350 scheint somit an für alle Zellen notwendigen Prozessen wie z.B. der Zellteilung oder dem Proteintransport beteiligt zu sein. CAP350 konnte zudem in allen untersuchten Zelllinien centrosomal gebunden nachgewiesen werden (Abb. 14 und 22). Verstärkt man jedoch die CAP350 Antikörpersignale mittels der Laserscan Mikroskop Software, so erkennt man, daß ein Anteil von CAP350 auch cytoplasmatisch, meist netzwerkartig, bzw. punktuell vorliegt. Überexpressionsstudien von CAP350 zeigen ebenfalls eine netzwerkartige Expression im Cytoplasma (Abb. 18F, 19B,C). Ob CAP350 direkt an den Mikrotubuli oder nur in direkter Nachbarschaft zu den Mikrotubuli lokalisiert vorliegt, konnte durch

die Immunfluoreszenzanalysen nicht eindeutig geklärt werden.

Da CAP350 zwar häufig in direkter Nachbarschaft zu den Mikrotubuli, aber nicht direkt mit ihnen kolokalisiert vorliegt (Abb. 18D), könnte man vermuten, daß CAP350 über Brückenproteine und somit eher indirekt mit den Mikrotubuli interagiert. Zusätzlich zur CAP-Gly Domäne enthält CAP350 jedoch einige „Coiled-coil“-Motive, die häufig in centrosomalen Proteinen gefunden werden und die für Protein-Protein Interaktionen eine große Rolle spielen. So ist bekannt, daß diese „Coiled-coil“-Motive an der Dimerisation oder an der Polymerisation beteiligt sind (Harborth et al., 1999). Ob CAP350 als Dimer oder Polymer vorliegt, kann durch Immunfluoreszenzanalysen nicht bestimmt werden. Die netzwerkartige Lokalisation von CAP350 in Zellen, bei denen durch Nocodazolbehandlung das Mikrotubulinetzwerk depolymerisiert wurde, läßt dies jedoch vermuten (Abb. 18E). Gerade die punktuelle Lokalisation von CAP350 im Cytoplasma könnte Aufschluß über die Funktion von CAP350 geben. Möglicherweise ist CAP350 am Vesikeltransport von Zellorganellen, bzw. Proteinen in Richtung Zellkern, ähnlich dem Dynein Motorkomplex, beteiligt (Burkhardt et al., 1997; Karki and Holzbaur, 1999). In diesen punktuellen Anlagerungen von CAP350 könnte es zum einen zu der Interaktion von CAP350 mit den zu transportierenden Proteinen und zum anderen mit dem eigentlichen Transportkomplex kommen. Wenn man annimmt, daß CAP350 nicht direkt mit den Mikrotubuli interagiert, könnte die Interaktion mit den Mikrotubuli über Brückenproteine dieses postulierten Transportkomplexes stattfinden. Durch die Größe des Transportkomplexes und durch die mögliche Lokalisation von CAP350 am Rande dieses Komplexes wäre die Lokalisation direkt neben den Mikrotubuli erklärbar. Jedoch ist es auch möglich, daß CAP350 nicht an der Transportmaschinerie aktiv beteiligt ist, sondern daß CAP350 passiv selber verstärkt durch diese Transportkomplexe transportiert wird. Ein Kandidat für den möglichen Transportkomplex, an dem CAP350 binden könnte, wäre der Dynein Multiproteinkomplex, der aktiv Proteine vom Cytoplasma zum Centrosom transportiert (Burkhardt et al., 1997; Karki and Holzbaur, 1999). Da die Überexpression von Dynamitin, einem Protein des Dynein Multiproteinkomplexes, den funktionsfähigen Dynein Komplex durch „sequestrating“ zerstört (Burkhardt et al., 1997), könnte so analysiert werden, ob CAP350 auch ohne einen funktionellen Dynein Multiproteinkomplex centrosomal lokalisiert vorliegt und somit ob der Transport von CAP350 aus dem Cytoplasma ans Centrosom über diesen Motorkomplex läuft. Durch Kotretransfektionen von CAP350 und Dynamitin könnte außerdem getestet werden, ob CAP350 auch ohne einen funktionellen Dynein Transportkomplex faserartige Lokalisation zeigt oder nicht. Falls die centrosomale und die faserartige Lokalisation von CAP350 trotz Überexpression von Dynamitin erhalten bleibt, würde dies eine Rolle von CAP350 an Dynein vermittelten Transportprozessen ausschließen.

CAP350 liegt auch nach Depolymerisation der Mikrotubuli durch Nocodazol weiterhin schwach centrosomal vor (Abb. 18B,E). Darüber hinaus wird in einigen Zellen nicht nur das Centrosom als ganzes, sondern beide Centriolen mit den CAP350 Antikörpern angefärbt (Abb. 14D,E, und Abb. 24C,D). Dies deutet darauf hin, daß CAP350 nicht wegen der hohen Mikrotubulidichte am Centrosom lokalisiert ist, da in diesem Fall eine Färbung der einzelnen Centriolen nicht erklärbar wäre, da die Mikrotubuli von der pericentriolaren Masse des Centrosoms und nicht direkt von den Centriolen ausgehen. Die Färbung der einzelnen Centriolen läßt vielmehr vermuten, daß CAP350 nicht mit der pericentriolaren Masse interagiert, sondern direkt oder über Brückenproteine mit den Centriolen selber interagiert. Die Hauptbestandteile der Centriolen sind, genau wie die Hauptbestandteile der Mikrotubuli, α - und β -Tubuline. Dies scheint eher dafür zu sprechen, daß CAP350 direkt mit den polymerisierten Tubulinen der Centriolen und auch mit den polymerisierten Tubulinen der Mikrotubuli interagiert. Die verstärkte Interaktion mit den centrosomalen Tubulinen im Vergleich mit den cytoplasmatischen Tubulinen der Mikrotubuli könnte durch spezifische posttranslationale Modifikationen der centrosomalen Tubuline oder durch zusätzliche, die CAP350-Tubulin Bindung verstärkende, centrosomale Proteine erreicht werden. Von den centriolaren Tubulinen ist bekannt, daß diese durch posttranslationale Modifikation vorzugsweise an den α -Tubulinen polyglutaminiert vorliegen (Bobinnec et al., 1998). So könnte es sein, daß durch die Polyglutaminierung von α -Tubulin die Interaktion mit CAP350 verstärkt wird und CAP350 deshalb hauptsächlich am Centrosom vorliegt.

Die centrosomale Lokalisation und das ubiquitäre Vorhandensein von CAP350 lassen auf eine mögliche Beteiligung an essentiellen Zellteilungsprozessen schließen, da das Centrosom für den Aufbau der mitotischen Spindel notwendig ist. Um eine Beteiligung von CAP350 an Zellteilungsprozessen zu eruieren, wurden transient überexprimierende Zellen in FACS-Analysen untersucht. Hierzu wurde ein CAP350-DsRed Fusionsprotein erstellt, da so die leuchtenden, transfizierten Zellen von den nicht leuchtenden, untransfizierten Zellen unterschieden werden konnten. Da jedoch das CAP350-DsRed Fusionsprotein keine Fluoreszenz zeigte, wurde ein CAP350(As 1-1928)-DsRed Fusionsprotein in der Zellzyklusanalyse eingesetzt. Es zeigte sich jedoch, daß der N-terminale Anteil CAP350(As 1-1928) die Zellzyklusverteilung der transfizierten Zellen nicht signifikant beeinflusst (Abb. 20D-F). Zudem konnte durch Immunfluoreszenzanalysen gezeigt werden, daß auch stark CAP350 exprimierende Zellen in verschiedenen Mitosestadien

vorliegen und somit auch diese Zellen offensichtlich in der Lage sind, die Mitose durchzuführen (Abb. 19 C). Ein Indiz für die Beteiligung an Zellteilungsprozessen ist jedoch, daß in stabil das N-terminale DsRed Deletionsfusionsprotein CAP350(As 1-1928)-DsRed exprimierenden Zellen, der Anteil der Zellen, die das DsRed Fusionsprotein exprimieren, mit zunehmender Passagenzahl abnimmt (Daten nicht gezeigt). Es wäre möglich, daß die überexprimierenden Zellen langsamer als schwach oder nicht exprimierende Zellen durch den Zellzyklus gelangen und somit die überexprimierenden Zellen mit zunehmender Passagenzahl überwachsen werden. Sofern alle Zellteilungsstadien durch die Überexpression des N-terminalen CAP350 Anteils beeinflußt werden und somit alle Zellteilungsstadien gleichmäßig langsamer ablaufen, wäre die Zellzyklusverteilung auch nicht beeinflußt und somit in einer FACS-Analyse keine Veränderung erkennbar. Eine Überexpression eines an der Mitose beteiligten Proteins muß außerdem nicht notwendigerweise eine Beeinträchtigung an dem Zellzyklus bedeuten. Sofern es durch die Überexpression nicht zu „sequestration“-Effekten kommt, also keine mit CAP350 interagierenden, für die Zellteilung essentiellen Proteine an ihren Funktionen gehindert würden, wäre eine Auswirkung auf die Zellzyklusverteilung nicht zu erwarten.

Um eine Beteiligung von CAP350 an Zellzyklusprozessen näher zu untersuchen, sollten demnach besser nicht Überexpressionsstudien, sondern „knock-out“ Untersuchungen durchgeführt werden, da bei einer eventuellen Beteiligung von CAP350 an der Zellproliferation ein Fehlen eines für die Zellteilung notwendigen Proteins, im Gegensatz zu Überexpressionsstudien, Auswirkungen im Zellzyklus haben müßte. Das ubiquitäre Vorhandensein von CAP350 und eine mögliche Beteiligung an Transportmechanismen und Zellteilungsprozessen läßt vermuten, daß ein echter „knock-out“ letal und eine CAP350 „knock-out“ Maus so möglicherweise nicht lebensfähig wäre. Man ist inzwischen jedoch in der Lage, konditionale „knock-out“ Mäuse herzustellen, also Mäuse, die nur in einem bestimmten Gewebe defizient an dem entsprechenden Protein sind.

4.2.5 Die CAP350 Expression im Hodengewebe

Sowohl die Northernblotanalysen als auch die RT-PCR Reaktionen weisen darauf hin, daß CAP350 verstärkt im Hodengewebe exprimiert wird (Abb. 23A und C). Zusätzlich zeigen die RNA Analysen auf Hoden RNA von Ratten in unterschiedlichen Altersstadien, daß die Expression der CAP350 mRNA in Ratten vor der Pubertät deutlich geringer ist als bei Ratten während oder nach der Pubertät. Dies läßt eine besondere Rolle von CAP350 in der Spermiogenese vermuten, denn in Ratten vor der Pubertät findet die Spermiogenese noch nicht vollständig statt.

Da bei den Paraffinschnitten die affinitätsgereinigten Antikörper Probleme mit der Erkennung von CAP350 haben, wurden zusätzlich Hoden-Quetschpräparate erstellt, die sich genauso unproblematisch wie Zellkulturzellen und Gefrierschnitte in der Immunfluoreszenzanalyse verhalten (Abb. 24). In den Quetschpräparaten erkennt man eindeutig centrosomale CAP350 Lokalisation in den reifen Spermatiden, wobei eine Lokalisation an den beiden Centriolen durch zwei Antikörpersignale, die mit dem Signal für γ -Tubulin kolokalisieren, nachweisbar ist (Abb. 24C, D). Ob es sich bei der in Abb. 24A gezeigten Zelle (rechts oben) um eine Spermatocyte handelt, ist auf Grund des Fehlens der Gewebestruktur nicht genau auszumachen, jedoch wahrscheinlich. Auch in dieser Zelle ist eine klare centrosomale Lokalisation von CAP350 nachweisbar. Zusätzlich zu der auch in Zellkulturzellen beobachteten centrosomalen Lokalisation von CAP350 erkennt man in den Spermatiden eine CAP350 Lokalisation direkt am kondensierten Zellkern, die nachläßt je stärker der Zellkern kondensiert wird, also je reifer die Spermatiden sind (Abb. 24A). Die centrosomale Lokalisation von CAP350 läßt vermuten, daß CAP350 auch in der Spermiogenese dieselben grundsätzlichen Aufgaben wahrnimmt wie in anderen Zellen. Die zusätzliche Lokalisation von CAP350 direkt am Zellkern am Ansatz der aus α - und β -Tubulinen bestehenden Manschette, die in den späteren Stadien der Spermiogenese abgebaut wird, deutet auf eine Beteiligung an der Ausbildung und/oder dem Abbau der Manschette hin. Interessant scheint, daß CAP350 im Laufe der Spermiogenese in unterschiedlichen zellulären Bereichen vorkommt. In den Spermatocyten ist eine centrosomale Lokalisation zu erkennen (Abb. 24A, rechts oben). Die centrosomale Lokalisation scheint in der Phase, in der die Manschette an den Spermatiden gebildet wird, aufgelöst zu werden, da in diesen Stadien nur noch Färbungen um den Zellkern erkennbar sind, wobei der Hauptanteil von CAP350 an den Ausgangspunkten der Manschetten-Mikrotubuli liegt (Abb. 24A). Nachdem der Zellkern vollständig kondensiert und die Manschette abgebaut worden ist, kann man

die centrosomale Lokalisation in den Rattenspermien wieder klar erkennen (Abb. 24A links oben, 24C). Am Ende der Spermiogenese, in der das Centrosom in Nagetier-Spermien abgebaut wird, liegt CAP350 wahrscheinlich in dem Mittelstück des Spermiums vor (Abb. 26A und B). CAP350 kann somit in allen Stadien der Spermiogenese nachgewiesen werden. Die in den Northernblot- und RT-PCR Analysen festgestellte verstärkte CAP350 RNA Expression auf Rattenhoden stimmt somit gut mit den beobachteten Ergebnissen der Immunfluoreszenzanalyse überein.

Die komplexe Lokalisation von CAP350 während der Spermiogenese läßt vermuten, daß CAP350 in der Spermiogenese nicht ausschließlich dieselben Funktionen wie in sonstigen Geweben, sondern zusätzlich spezifische Aufgaben übernimmt. Ob bei der Umorganisation der CAP350 Lokalisation im Laufe der Spermiogenese die Expression unterschiedlicher „splice“-Varianten, die Ausbildung von posttranslationalen Modifikationen oder die Interaktion mit anderen im Laufe der Spermiogenese regulierten Proteinen eine Rolle spielt, muß noch weiter untersucht werden. Die Interaktion von CAP350 mit den Mikrotubuli spielt bei dieser Umorganisation möglicherweise eine entscheidende Rolle.

Um die Funktion von CAP350 in der Spermiogenese zu eruieren, sollten konditionale „knock-out“-Mäuse, die spezifisch im Hodengewebe CAP350 defizient wären, erstellt werden. In einem durch Tamoxifen induzierbaren, konditionalen „knock-out“-System könnte zudem die Spermiogenese in adulten, geschlechtsreifen Tieren vor und nach dem Ausschalten der CAP350 Expression analysiert werden. Die Bestimmung der Rolle von CAP350 in der Spermiogenese sollte so möglich sein.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei zuvor in unserer Arbeitsgruppe identifizierte, putative Kofaktoren des PR analysiert und charakterisiert.

Die transaktivierende Wirkung der von Dr. Klotzbücher in Rattenleber-Kernextrakt identifizierten Kofaktorfraktion COPRA konnte in einem rekonstituierten in-vitro Transkriptionssystem nachvollzogen und COPRA aus der Kofaktor haltigen Fraktion weiter angereichert werden. Die Analyse der PR Bereiche, die für die COPRA Aktivierung notwendig sind, zeigte, daß die Wirkung von COPRA nicht, wie von anderen Kofaktoren vermutet, über die C-terminale Helix 12 des PR läuft. Jedoch sind trotzdem C-terminale Sequenzanteile des PR für die COPRA Wirkung notwendig. In Interaktionsstudien konnte weder eine stabile Interaktion zwischen COPRA und dem PR, noch zwischen COPRA und CBP-Komplexen nachgewiesen werden. Die Analyse von COPRA in einem Chromatin Umfeld zeigte weder nukleosomale „remodelling“-Aktivitäten, noch eine klare Chromatin spezifische, PR vermittelte Transaktivierung in der in-vitro Transkription. Somit reguliert COPRA die Aktivierung des PR wahrscheinlich nicht über die Chromatinstruktur.

Von der von Dr. Schwerk gefundenen, in einer Hefe-Interaktionsanalyse hormonabhängig mit dem PR interagierenden 114-2 cDNA Sequenz, die von Dr. Michels in 5'- und 3'-Richtung verlängert wurde, konnte die 11740 Basenpaare lange cDNA Sequenz durch Datenbankvergleiche und durch RT-PCR Reaktionen mit anschließender Sequenzierung identifiziert werden. Die genomische DNA Sequenz liegt auf dem humanen Chromosom 1 und besteht aus mindestens 31 Exons. Da das gefundene Protein centrosomal lokalisiert vorliegt und da es 350 kD groß ist, wurde es CAP350 (centrosomal associated protein of 350 kD) benannt. Das CAP350 Protein besteht aus 3117 Aminosäuren und enthält sieben „Coiled-coil“-Domänen, sieben Kernlokalisationssignale und eine CAP-Gly Domäne. Eine Interaktion von CAP350 mit dem PR konnte in Immunpräzipitationen und Immunfluoreszenzanalysen nicht bestätigt werden. Da das endogene CAP350 Protein in allen untersuchten Zellen und Geweben nachweisbar ist, handelt es sich wahrscheinlich um ein ubiquitär exprimiertes Protein, was eine Beteiligung von CAP350 an für die Zelle entscheidenden Funktionen vermuten läßt. Ein Einfluß von CAP350 auf die Zellzyklusverteilung konnte in FACS Untersuchungen in transient überexprimierenden Zellen nicht nachgewiesen werden. Wie RNA Analysen verdeutlichen, wird CAP350 in großen Konzentrationen im Hoden, jedoch verstärkt erst nach dem Beginn der Pubertät, exprimiert. Immunfluoreszenzanalysen zeigen eine Umorganisation der CAP350 Lokalisation im Laufe der Spermiogenese. So liegt Ratten-CAP350 in den Spermatocyten centrosomal, in den Manschettenstadien der Spermatiden hauptsächlich an der Kernmembran, in den späten Stadien der Spermatiden an den beiden Centriolen und in den Spermien im Mittelstück vor. Eine Beteiligung von CAP350 an der Spermiogenese ist somit wahrscheinlich.

6 Literaturverzeichnis

- Adams,R.R., Tavares,A.A., Salzberg,A., Bellen,H.J., and Glover,D.M. (1998). pavarotti encodes a kinesin-like protein required to organize the central spindle and contractile ring for cytokinesis. *Genes Dev.* 12, 1483-1494.
- Allan,J., Hartman,P.G., Crane-Robinson,C., and Aviles,F.X. (1980). The structure of histone H1 and its location in chromatin. *Nature* 288, 675-679.
- Allan,J., Cowling,G.J., Harborne,N., Cattini,P., Craigie,R., and Gould,H. (1981). Regulation of the higher-order structure of chromatin by histones H1 and H5. *J. Cell Biol.* 90, 279-288.
- Allan,J., Mitchell,T., Harborne,N., Bohm,L., and Crane-Robinson,C. (1986). Roles of H1 domains in determining higher order chromatin structure and H1 location. *J. Mol. Biol.* 187, 591-601.
- Anzick,S.L., Kononen,J., Walker,R.L., Azorsa,D.O., Tanner,M.M., Guan,X.Y., Sauter,G., Kallioniemi,O.P., Trent,J.M., and Meltzer,P.S. (1997). AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science* 277, 965-968.
- Arents,G., Burlingame,R.W., Wang,B.C., Love,W.E., and Moudrianakis,E.N. (1991). The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 10148-10152.
- Ausio,J. and van Holde,K.E. (1988). The histones of the sperm of *Spisula solidissima* include a novel, cysteine-containing H-1 histone. *Cell Differ.* 23, 175-189.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. (1991). *Current protocols in molecular biology* (New York: Greene publishing associates and Wiley-interscience).
- Balczon,R., Bao,L., Zimmer,W.E., Brown,K., Zinkowski,R.P., and Brinkley,B.R. (1995). Dissociation of centrosome replication events from cycles of DNA synthesis and mitotic division in hydroxyurea-arrested Chinese hamster ovary cells. *J. Cell Biol.* 130, 105-115.
- Bannister,A.J. and Kouzarides,T. (1996). The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* 384, 641-643.
- Bergen,L.G., Kuriyama,R., and Borisy,G.G. (1980). Polarity of microtubules nucleated by centrosomes and chromosomes of Chinese hamster ovary cells in vitro. *J. Cell Biol.* 84, 151-159.
- Bernardini, G., Stipat, H., and Melone, G. (1986). The ultrastructure of *Xenopus* spermatozoon. *J. Ultrast. Mol. Struct. Res.* 94, 188-194.
- Birnboim,H.C. and Doly,J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-1523.
- Blanco,J.C., Minucci,S., Lu,J., Yang,X.J., Walker,K.K., Chen,H., Evans,R.M., Nakatani,Y., and Ozato,K. (1998). The histone acetylase PCAF is a nuclear receptor coactivator. *Genes Dev.* 12, 1638-1651.

- Bobinnec,Y., Moudjou,M., Fouquet,J.P., Desbruyeres,E., Edde,B., and Bornens,M. (1998). Glutamylolation of centriole and cytoplasmic tubulin in proliferating non- neuronal cells. *Cell Motil. Cytoskeleton* 39, 223-232.
- Bohen,S.P. (1995). Hsp90 mutants disrupt glucocorticoid receptor ligand binding and destabilize aporeceptor complexes. *J. Biol. Chem.* 270, 29433-29438.
- Bohen,S.P., Kralli,A., and Yamamoto,K.R. (1995). Hold 'em and fold 'em: chaperones and signal transduction. *Science* 268, 1303-1304.
- Brinkley,B.R. and Goepfert,T.M. (1998). Supernumerary centrosomes and cancer: Boveri's hypothesis resurrected. *Cell Motil. Cytoskeleton* 41, 281-288.
- Brownell,J.E., Zhou,J., Ranalli,T., Kobayashi,R., Edmondson,D.G., Roth,S.Y., and Allis,C.D. (1996). Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell* 84, 843-851.
- Buratowski,S., Hahn,S., Sharp,P.A., and Guarente,L. (1988). Function of a yeast TATA element-binding protein in a mammalian transcription system. *Nature* 334, 37-42.
- Buratowski,S., Hahn,S., Guarente,L., and Sharp,P.A. (1989). Five intermediate complexes in transcription initiation by RNA polymerase II. *Cell* 56, 549-561.
- Burke,T.W. and Kadonaga,J.T. (1996). Drosophila TFIID binds to a conserved downstream basal promoter element that is present in many TATA-box-deficient promoters. *Genes Dev.* 10, 711-724.
- Burkhardt,J.K., Echeverri,C.J., Nilsson,T., and Vallee,R.B. (1997). Overexpression of the dynamitin (p50) subunit of the dynactin complex disrupts dynein-dependent maintenance of membrane organelle distribution. *J. Cell Biol.* 139, 469-484.
- Cairns,B.R., Kim,Y.J., Sayre,M.H., Laurent,B.C., and Kornberg,R.D. (1994). A multisubunit complex containing the SWI1/ADR6, SWI2/SNF2, SWI3, SNF5, and SNF6 gene products isolated from yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 1950-1954.
- Castillo,G., Brun,R.P., Rosenfield,J.K., Hauser,S., Park,C.W., Troy,A.E., Wright,M.E., and Spiegelman,B.M. (1999). An adipogenic cofactor bound by the differentiation domain of PPARgamma. *EMBO J.* 18, 3676-3687.
- Cato,A.C., Heitlinger,E., Ponta,H., Klein-Hitpass,L., Ryffel,G.U., Bailly,A., Rauch,C., and Milgrom,E. (1988). Estrogen and progesterone receptor-binding sites on the chicken vitellogenin II gene: synergism of steroid hormone action. *Mol. Cell Biol.* 8, 5323-5330.
- Cavaillès,V., Dauvois,S., L'Horset,F., Lopez,G., Hoare,S., Kushner,P.J., and Parker,M.G. (1995). Nuclear factor RIP140 modulates transcriptional activation by the estrogen receptor. *EMBO J.* 14, 3741-3751.
- Chen,H., Lin,R.J., Schiltz,R.L., Chakravarti,D., Nash,A., Nagy,L., Privalsky,M.L., Nakatani,Y., and Evans,R.M. (1997). Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell* 90, 569-580.

- Chen,H., Lin,R.J., Schiltz,R.L., Chakravarti,D., Nash,A., Nagy,L., Privalsky,M.L., Nakatani,Y., and Evans,R.M. (1997). Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell* 90, 569-580.
- Chen,J.L., Attardi,L.D., Verrijzer,C.P., Yokomori,K., and Tjian,R. (1994). Assembly of recombinant TFIID reveals differential coactivator requirements for distinct transcriptional activators. *Cell* 79, 93-105.
- Chen,T.A. and Allfrey,V.G. (1987). Rapid and reversible changes in nucleosome structure accompany the activation, repression, and superinduction of murine fibroblast protooncogenes c-fos and c-myc. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 84, 5252-5256.
- Chen,T.A., Sterner,R., Cozzolino,A., and Allfrey,V.G. (1990). Reversible and irreversible changes in nucleosome structure along the c- fos and c-myc oncogenes following inhibition of transcription. *J. Mol. Biol.* 212, 481-493.
- Cheng,A., Balczon,R., Zuo,Z., Koons,J.S., Walsh,A.H., and Honkanen,R.E. (1998). Fostriecin-mediated G2-M-phase growth arrest correlates with abnormal centrosome replication, the formation of aberrant mitotic spindles, and the inhibition of serine/threonine protein phosphatase activity. *Cancer Res.* 58, 3611-3619.
- Cline,C.A., Schatten,H., Balczon,R., and Schatten,G. (1983). Actin-mediated surface motility during sea urchin fertilization. *Cell Motil.* 3, 513-524.
- Comes,P. and Franke,W.W. (1970). Composition, structure and function of HeLa cell nuclear envelope. I. Structural data. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 107, 240-248.
- Conaway,R.C. and Conaway,J.W. (1993). General initiation factors for RNA polymerase II. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 161-190.
- Csordas,A. (1990). On the biological role of histone acetylation. *Biochem. J.* 265, 23-38.
- Debec,A. and Abbadie,C. (1989). The acentriolar state of the Drosophila cell lines 1182. *Biol. Cell* 67, 307-311.
- DeLange,R.J., Fambrough,D.M., Smith,E.L., and Bonner,J. (1969). Calf and pea histone IV. 3. Complete amino acid sequence of pea seedling histone IV; comparison with the homologous calf thymus histone. *J. Biol. Chem.* 244, 5669-5679.
- DeLange,R.J., Fambrough,D.M., Smith,E.L., and Bonner,J. (1969). Calf and pea histone IV. II. The complete amino acid sequence of calf thymus histone IV; presence of epsilon-N-acetyllysine. *J. Biol. Chem.* 244, 319-334.
- DeMarzo,A.M., Beck,C.A., Onate,S.A., and Edwards,D.P. (1991). Dimerization of mammalian progesterone receptors occurs in the absence of DNA and is related to the release of the 90-kDa heat shock protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 72-76.
- Desai,A. and Mitchison,T.J. (1997). Microtubule polymerization dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13, 83-117.

- Dictenberg,J.B., Zimmerman,W., Sparks,C.A., Young,A., Vidair,C., Zheng,Y., Carrington,W., Fay,F.S., and Doxsey,S.J. (1998). Pericentrin and gamma-tubulin form a protein complex and are organized into a novel lattice at the centrosome. *J. Cell Biol.* 141, 163-174.
- Dobbeling,U., Ross,K., Klein-Hitpass,L., Morley,C., Wagner,U., and Ryffel,G.U. (1988). A cell-specific activator in the *Xenopus* A2 vitellogenin gene: promoter elements functioning with rat liver nuclear extracts. *EMBO J.* 7, 2495-2501.
- Doxsey,S.J., Stein,P., Evans,L., Calarco,P.D., and Kirschner,M. (1994). Pericentrin, a highly conserved centrosome protein involved in microtubule organization. *Cell* 76, 639-650.
- Dynlacht,B.D., Hoey,T., and Tjian,R. (1991). Isolation of coactivators associated with the TATA-binding protein that mediate transcriptional activation. *Cell* 66, 563-576.
- Eggert,M., Mows,C.C., Tripier,D., Arnold,R., Michel,J., Nickel,J., Schmidt,S., Beato,M., and Renkawitz,R. (1995). A fraction enriched in a novel glucocorticoid receptor- interacting protein stimulates receptor-dependent transcription in vitro. *J. Biol. Chem.* 270, 30755-30759.
- Erickson,H.P. and Stoffler,D. (1996). Protofilaments and rings, two conformations of the tubulin family conserved from bacterial FtsZ to alpha/beta and gamma tubulin. *J. Cell Biol.* 135, 5-8.
- Evans,R.M. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240, 889-895.
- Felsenfeld,G. (1996). Chromatin unfolds. *Cell* 86, 13-19.
- Flory,M.R., Moser,M.J., Monnat,R.J., and Davis,T.N. (2000). Identification of a human centrosomal calmodulin-binding protein that shares homology with pericentrin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 5919-5923.
- Fondell,J.D., Ge,H., and Roeder,R.G. (1996). Ligand induction of a transcriptionally active thyroid hormone receptor coactivator complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 8329-8333.
- Freedman,L.P. (1992). Anatomy of the steroid receptor zinc finger region. *Endocr. Rev.* 13, 129-145.
- Fry,A.M., Mayor,T., Meraldi,P., Stierhof,Y.D., Tanaka,K., and Nigg,E.A. (1998). C-Nap1, a novel centrosomal coiled-coil protein and candidate substrate of the cell cycle-regulated protein kinase Nek2. *J. Cell Biol.* 141, 1563-1574.
- Fry,A.M., Schultz,S.J., Bartek,J., and Nigg,E.A. (1995). Substrate specificity and cell cycle regulation of the Nek2 protein kinase, a potential human homolog of the mitotic regulator NIMA of *Aspergillus nidulans*. *J. Biol. Chem.* 270, 12899-12905.
- Fukasawa,K., Choi,T., Kuriyama,R., Rulong,S., and Vande Woude,G.F. (1996). Abnormal centrosome amplification in the absence of p53. *Science* 271, 1744-1747.
- Gard,D.L., Hafezi,S., Zhang,T., and Doxsey,S.J. (1990). Centrosome duplication continues in cycloheximide-treated *Xenopus* blastulae in the absence of a detectable cell cycle. *J. Cell Biol.* 110, 2033-2042.

- Giannakakou,P., Sackett,D.L., Ward,Y., Webster,K.R., Blagosklonny,M.V., and Fojo,T. (2000). p53 is associated with cellular microtubules and is transported to the nucleus by dynein. *Nat. Cell Biol.* 2, 709-717.
- Giguere,V., Hollenberg,S.M., Rosenfeld,M.G., and Evans,R.M. (1986). Functional domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell* 46, 645-652.
- Griparic,L. and Keller,T.C. (1998). Identification and expression of two novel CLIP-170/Restin isoforms expressed predominantly in muscle. *Biochim. Biophys. Acta* 1405, 35-46.
- Gong,W., Chavez,S., and Beato,M. (1997). Point mutation in the ligand-binding domain of the progesterone receptor generates a transdominant negative phenotype. *Mol. Endocrinol.* 11, 1476-1485.
- Goodrich,J.A., Hoey,T., Thut,C.J., Admon,A., and Tjian,R. (1993). Drosophila TAFII40 interacts with both a VP16 activation domain and the basal transcription factor TFIIB. *Cell* 75, 519-530.
- Goodrich,J.A., Cutler,G., and Tjian,R. (1996). Contacts in context: promoter specificity and macromolecular interactions in transcription. *Cell* 84, 825-830.
- Gorman,C.M., Howard,B.H., and Reeves,R. (1983). Expression of recombinant plasmids in mammalian cells is enhanced by sodium butyrate. *Nucleic Acids Res.* 11, 7631-7648.
- Gorski,K., Carneiro,M., and Schibler,U. (1986). Tissue-specific in vitro transcription from the mouse albumin promoter. *Cell* 47, 767-776.
- Green,S. and Chambon,P. (1986). A superfamily of potentially oncogenic hormone receptors. *Nature* 324, 615-617.
- Greenfield,M.L. (1966). The oocyte of the domestic chicken shortly after hatching, studied by electron microscopy. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 15, 297-316.
- Hagemeier,C., Walker,S., Caswell,R., Kouzarides,T., and Sinclair,J. (1992). The human cytomegalovirus 80-kilodalton but not the 72-kilodalton immediate-early protein transactivates heterologous promoters in a TATA box-dependent mechanism and interacts directly with TFIID. *J. Virol.* 66, 4452-4456.
- Halachmi,S., Marden,E., Martin,G., MacKay,H., Abbondanza,C., and Brown,M. (1994). Estrogen receptor-associated proteins: possible mediators of hormone- induced transcription. *Science* 264, 1455-1458.
- Harborth,J., Wang,J., Gueth-Hallonet,C., Weber,K., and Osborn,M. (1999). Self assembly of NuMA: multiarm oligomers as structural units of a nuclear lattice. *EMBO J.* 18, 1689-1700.
- Hassig,C.A., Tong,J.K., Fleischer,T.C., Owa,T., Grable,P.G., Ayer,D.E., and Schreiber,S.L. (1998). A role for histone deacetylase activity in HDAC1-mediated transcriptional repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 3519-3524.
- Heery,D.M., Kalkhoven,E., Hoare,S., and Parker,M.G. (1997). A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* 387, 733-736.

- Henttu,P.M., Kalkhoven,E., and Parker,M.G. (1997). AF-2 activity and recruitment of steroid receptor coactivator 1 to the estrogen receptor depend on a lysine residue conserved in nuclear receptors. *Mol. Cell Biol.* 17, 1832-1839.
- Hernandez,N. (1993). TBP, a universal eukaryotic transcription factor? *Genes Dev.* 7, 1291-1308.
- Hertig,A.T. and Adams,E.C. (1967). Studies on the human oocyte and its follicle. I. Ultrastructural and histochemical observations on the primordial follicle stage. *J. Cell Biol.* 34, 647-675.
- Hinchcliffe,E.H., Cassels,G.O., Rieder,C.L., and Sluder,G. (1998). The coordination of centrosome reproduction with nuclear events of the cell cycle in the sea urchin zygote. *J. Cell Biol.* 140, 1417-1426.
- Hinchcliffe,E.H., Li,C., Thompson,E.A., Maller,J.L., and Sluder,G. (1999). Requirement of Cdk2-cyclin E activity for repeated centrosome reproduction in *Xenopus* egg extracts. *Science* 283, 851-854.
- Hoey,T., Weinzierl,R.O., Gill,G., Chen,J.L., Dynlacht,B.D., and Tjian,R. (1993). Molecular cloning and functional analysis of *Drosophila* TAF110 reveal properties expected of coactivators. *Cell* 72, 247-260.
- Hollenberg,S.M. and Evans,R.M. (1988). Multiple and cooperative trans-activation domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell* 55, 899-906.
- Holy,J. and Schatten,G. (1991). Spindle pole centrosomes of sea urchin embryos are partially composed of material recruited from maternal stores. *Dev. Biol.* 147, 343-353.
- Hong,H., Kohli,K., Trivedi,A., Johnson,D.L., and Stallcup,M.R. (1996). GRIP1, a novel mouse protein that serves as a transcriptional coactivator in yeast for the hormone binding domains of steroid receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 4948-4952.
- Horikoshi,N., Maguire,K., Kralli,A., Maldonado,E., Reinberg,D., and Weinmann,R. (1991). Direct interaction between adenovirus E1A protein and the TATA box binding transcription factor IID. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 5124-5128.
- Huchon,D., Crozet,N., Cantenot,N., and Ozon,R. (1981). Germinal vesicle breakdown in the *Xenopus laevis* oocyte: description of a transient microtubular structure. *Reprod. Nutr. Dev.* 21, 135-148.
- Ikeda,M., Kawaguchi,A., Takeshita,A., Chin,W.W., Endo,T., and Onaya,T. (1999). CBP-dependent and independent enhancing activity of steroid receptor coactivator-1 in thyroid hormone receptor-mediated transactivation. *Mol. Cell Endocrinol.* 147, 103-112.
- Ing,N.H., Beekman,J.M., Tsai,S.Y., Tsai,M.J., and O'Malley,B.W. (1992). Members of the steroid hormone receptor superfamily interact with TFIIB (S300-II). *J. Biol. Chem.* 267, 17617-17623.
- Ito,M., Yuan,C.X., Malik,S., Gu,W., Fondell,J.D., Yamamura,S., Fu,Z.Y., Zhang,X., Qin,J., and Roeder,R.G. (1999). Identity between TRAP and SMCC complexes indicates novel pathways for the function of nuclear receptors and diverse mammalian activators. *Mol. Cell* 3, 361-370.

- Jacq,X., Brou,C., Lutz,Y., Davidson,I., Chambon,P., and Tora,L. (1994). Human TAFII30 is present in a distinct TFIID complex and is required for transcriptional activation by the estrogen receptor. *Cell* 79, 107-117.
- Jeppesen,P. and Turner,B.M. (1993). The inactive X chromosome in female mammals is distinguished by a lack of histone H4 acetylation, a cytogenetic marker for gene expression. *Cell* 74, 281-289.
- Kahmann,S., Vassen,L., and Klein-Hitpass,L. (1998). Synergistic enhancement of PRB-mediated RU486 and R5020 agonist activities through cyclic adenosine 3',5'-monophosphate represents a delayed primary response. *Mol. Endocrinol.* 12, 278-289.
- Karki,S. and Holzbaur,E.L. (1999). Cytoplasmic dynein and dynactin in cell division and intracellular transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 45-53.
- Kim,H.J., Yi,J.Y., Sung,H.S., Moore,D.D., Jhun,B.H., Lee,Y.C., and Lee,J.W. (1999). Activating signal cointegrator 1, a novel transcription coactivator of nuclear receptors, and its cytosolic localization under conditions of serum deprivation. *Mol. Cell Biol.* 19, 6323-6332.
- Klein-Hitpass,L., Ryffel,G.U., Heitlinger,E., and Cato,A.C. (1988). A 13 bp palindrome is a functional estrogen responsive element and interacts specifically with estrogen receptor. *Nucleic. Acids. Res.* 16, 647-663.
- Klein-Hitpass,L., Tsai,S.Y., Greene,G.L., Clark,J.H., Tsai,M.J., and O'Malley,B.W. (1989). Specific binding of estrogen receptor to the estrogen response element. *Mol. Cell Biol.* 9, 43-49.
- Klein-Hitpass,L., Tsai,S.Y., Weigel,N.L., Allan,G.F., Riley,D., Rodriguez,R., Schrader,W.T., Tsai,M.J., and O'Malley,B.W. (1990). The progesterone receptor stimulates cell-free transcription by enhancing the formation of a stable preinitiation complex. *Cell* 60, 247-257.
- Klein,C. and Struhl,K. (1994). Increased recruitment of TATA-binding protein to the promoter by transcriptional activation domains in vivo. *Science* 266, 280-282.
- Klemm,R.D., Goodrich,J.A., Zhou,S., and Tjian,R. (1995). Molecular cloning and expression of the 32-kDa subunit of human TFIID reveals interactions with VP16 and TFIIB that mediate transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 5788-5792.
- Klotzbücher, M. (1996). Identifizierung und Charakterisierung eines Kofaktors der Progesteron Rezeptor-vermittelten Transkriptionsaktivierung. Dissertation Universität-GH-Essen
- Klotzbucher,M., Schwerk,C., Holewa,B., and Klein-Hitpass,L. (1997). Activation of transcription by progesterone receptor involves derepression of activation functions by a cofactor [In Process Citation]. *Mol. Endocrinol.* 11, 768-778.
- Ko,L., Cardona,G.R., and Chin,W.W. (2000). Thyroid hormone receptor-binding protein, an LXXLL motif-containing protein, functions as a general coactivator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 6212-6217.
- Koleske,A.J. and Young,R.A. (1994). An RNA polymerase II holoenzyme responsive to activators [see comments]. *Nature* 368, 466-469.

- Krust,A., Green,S., Argos,P., Kumar,V., Walter,P., Bornert,J.M., and Chambon,P. (1986). The chicken oestrogen receptor sequence: homology with v-erbA and the human oestrogen and glucocorticoid receptors. *EMBO J.* 5, 891-897.
- Kull,F.J., Sablin,E.P., Lau,R., Fletterick,R.J., and Vale,R.D. (1996). Crystal structure of the kinesin motor domain reveals a structural similarity to myosin. *Nature* 380, 550-555.
- Kumar,V., Green,S., Stack,G., Berry,M., Jin,J.R., and Chambon,P. (1987). Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell* 51, 941-951.
- Kuo,M.H., Brownell,J.E., Sobel,R.E., Ranalli,T.A., Cook,R.G., Edmondson,D.G., Roth,S.Y., and Allis,C.D. (1996). Transcription-linked acetylation by Gcn5p of histones H3 and H4 at specific lysines. *Nature* 383, 269-272.
- Lacey,K.R., Jackson,P.K., and Stearns,T. (1999). Cyclin-dependent kinase control of centrosome duplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 2817-2822.
- Laherty,C.D., Yang,W.M., Sun,J.M., Davie,J.R., Seto,E., and Eisenman,R.N. (1997). Histone deacetylases associated with the mSin3 corepressor mediate mad transcriptional repression. *Cell* 89, 349-356.
- Lange,B.M. and Gull,K. (1995). A molecular marker for centriole maturation in the mammalian cell cycle. *J. Cell Biol.* 130, 919-927.
- Laybourn,P.J. and Kadonaga,J.T. (1992). Threshold phenomena and long-distance activation of transcription by RNA polymerase II. *Science* 257, 1682-1685.
- Le Guen,P. and Crozet,N. (1989). Microtubule and centrosome distribution during sheep fertilization. *Eur. J. Cell Biol.* 48, 239-249.
- Lee,D.K., Horikoshi,M., and Roeder,R.G. (1991). Interaction of TFIID in the minor groove of the TATA element. *Cell* 67, 1241-1250.
- Lee,S.K., Jung,S.Y., Kim,Y.S., Na,S.Y., Lee,Y.C., and Lee,J.W. (2001). Two Distinct Nuclear Receptor-Interaction Domains and CREB-Binding Protein-Dependent Transactivation Function of Activating Signal Cointegrator-2. *Mol. Endocrinol.* 15, 241-254.
- Li,H., Gomes,P.J., and Chen,J.D. (1997). RAC3, a steroid/nuclear receptor-associated coactivator that is related to SRC-1 and TIF2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 8479-8484.
- Li,Q. and Wrangé,O. (1993). Translational positioning of a nucleosomal glucocorticoid response element modulates glucocorticoid receptor affinity. *Genes Dev.* 7, 2471-2482.
- Libertini,L.J., Ausio,J., van Holde,K.E., and Small,E.W. (1988). Histone hyperacetylation. Its effects on nucleosome core particle transitions. *Biophys. J.* 53, 477-487.
- Lieberman,P.M. and Berk,A.J. (1994). A mechanism for TAFs in transcriptional activation: activation domain enhancement of TFIID-TFIIA--promoter DNA complex formation. *Genes Dev.* 8, 995-1006.

- Lin,R., Leone,J.W., Cook,R.G., and Allis,C.D. (1989). Antibodies specific to acetylated histones document the existence of deposi. *J. Cell Biol.* 108, 1577-1588.
- Lin,Y.S., Ha,I., Maldonado,E., Reinberg,D., and Green,M.R. (1991). Binding of general transcription factor TFIIB to an acidic activating region. *Nature* 353, 569-571.
- Lingle,W.L., Lutz,W.H., Ingle,J.N., Maihle,N.J., and Salisbury,J.L. (1998). Centrosome hypertrophy in human breast tumors: implications for genomic stability and cell polarity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 2950-2955.
- Liu,Z., Wong,J., Tsai,S.Y., Tsai,M.J., and O'Malley,B.W. (1999). Steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) enhances ligand-dependent and receptor-dependent cell-free transcription of chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 9485-9490.
- Llamazares,S., Moreira,A., Tavares,A., Girdham,C., Spruce,B.A., Gonzalez,C., Karess,R.E., Glover,D.M., and Sunkel,C.E. (1991). polo encodes a protein kinase homolog required for mitosis in *Drosophila*. *Genes Dev.* 5, 2153-2165.
- Luger,K., Mader,A.W., Richmond,R.K., Sargent,D.F., and Richmond,T.J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251-260.
- Luisi,B.F., Xu,W.X., Otwinowski,Z., Freedman,L.P., Yamamoto,K.R., and Sigler,P.B. (1991). Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature* 352, 497-505.
- Mader,S., Chambon,P., and White,J.H. (1993). Defining a minimal estrogen receptor DNA binding domain. *Nucleic Acids Res.* 21, 1125-1132.
- Madison,J.M. and Winston,F. (1997). Evidence that Spt3 functionally interacts with Mot1, TFIIA, and TATA- binding protein to confer promoter-specific transcriptional control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 17, 287-295.
- Mahowald A.P. and Strassheim J.M. (1970). Intracellular migration of centrioles in germlarium of *Drosophila melanogaster*. An electron microscopy study. *J. Cell. Biol* 45, 306-320.
- Maldonado,E., Ha,I., Cortes,P., Weis,L., and Reinberg,D. (1990). Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II: role of transcription factors IIA, IID, and IIB during formation of a transcription-competent complex. *Mol. Cell Biol.* 10, 6335-6347.
- Manandhar,G., Sutovsky,P., Joshi,H.C., Stearns,T., and Schatten,G. (1998). Centrosome reduction during mouse spermiogenesis. *Dev. Biol.* 203, 424-434.
- Maniotis,A. and Schliwa,M. (1991). Microsurgical removal of centrosomes blocks cell reproduction and centriole generation in BSC-1 cells. *Cell* 67, 495-504.
- Martin,O.C., Gunawardane,R.N., Iwamatsu,A., and Zheng,Y. (1998). Xgrip109: a gamma tubulin-associated protein with an essential role in gamma tubulin ring complex (gammaTuRC) assembly and centrosome function. *J. Cell Biol.* 141, 675-687.
- Matsui,T., Segall,J., Weil,P.A., and Roeder,R.G. (1980). Multiple factors required for accurate initiation of transcription by purified RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* 255, 11992-11996.

- Matsumoto,Y., Hayashi,K., and Nishida,E. (1999). Cyclin-dependent kinase 2 (Cdk2) is required for centrosome duplication in mammalian cells. *Curr. Biol.* 9, 429-432.
- McIntosh,J.R. and Euteneuer,U. (1984). Tubulin hooks as probes for microtubule polarity: an analysis of the method and an evaluation of data on microtubule polarity in the mitotic spindle. *J. Cell Biol.* 98, 525-533.
- Meraldi,P., Lukas,J., Fry,A.M., Bartek,J., and Nigg,E.A. (1999). Centrosome duplication in mammalian somatic cells requires E2F and Cdk2- cyclin A. *Nat. Cell Biol.* 1, 88-93.
- Merdes,A., Ramyar,K., Vechio,J.D., and Cleveland,D.W. (1996). A complex of NuMA and cytoplasmic dynein is essential for mitotic spindle assembly. *Cell* 87, 447-458.
- Mermall,V., Post,P.L., and Mooseker,M.S. (1998). Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction. *Science* 279, 527-533.
- Meyer,M.E., Gronemeyer,H., Turcotte,B., Bocquel,M.T., Tasset,D., and Chambon,P. (1989). Steroid hormone receptors compete for factors that mediate their enhancer function. *Cell* 57, 433-442.
- Michels, D. (1999). Charakterisierung putativer Cofaktoren der Progesteron-Rezeptor vermittelten Transaktivierung. Dissertation Universität-GH-Essen
- Mignot,J.P. (1996). [New hypothesis on the replication of centrioles and basal bodies]. *C. R. Acad. Sci. III* 319, 1093-1099.
- Moritz,M., Braunfeld,M.B., Sedat,J.W., Alberts,B., and Agard,D.A. (1995). Microtubule nucleation by gamma-tubulin-containing rings in the centrosome. *Nature* 378, 638-640.
- Moritz,M., Zheng,Y., Alberts,B.M., and Oegema,K. (1998). Recruitment of the gamma-tubulin ring complex to *Drosophila* salt- stripped centrosome scaffolds. *J. Cell Biol.* 142, 775-786.
- Moudrianakis,E.N. and Arents,G. (1993). Structure of the histone octamer core of the nucleosome and its potential interactions with DNA. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 58, 273-279.
- Muller,J.M., Isele,U., Metzger,E., Rempel,A., Moser,M., Pscherer,A., Breyer,T., Holubarsch,C., Buettner,R., and Schule,R. (2000). FHL2, a novel tissue-specific coactivator of the androgen receptor. *EMBO J.* 19, 359-369.
- Munro,S. and Nichols,B.J. (1999). The GRIP domain – a novel Golgi-targeting domain found in several coiled-coil proteins *Curr. Biol.* 9, 377-380.
- Murphy,S.M., Urbani,L., and Stearns,T. (1998). The mammalian gamma-tubulin complex contains homologues of the yeast spindle pole body components spc97p and spc98p. *J. Cell Biol.* 141, 663-674.
- Myer,V.E. and Young,R.A. (1998). RNA polymerase II holoenzymes and subcomplexes. *J. Biol. Chem.* 273, 27757-27760.

- Naar,A.M., Beaurang,P.A., Robinson,K.M., Oliner,J.D., Avizonis,D., Scheek,S., Zwicker,J., Kadonaga,J.T., and Tjian,R. (1998). Chromatin, TAFs, and a novel multiprotein coactivator are required for synergistic activation by Sp1 and SREBP-1a in vitro. *Genes Dev.* 12, 3020-3031.
- Nagy,L., Kao,H.Y., Chakravarti,D., Lin,R.J., Hassig,C.A., Ayer,D.E., Schreiber,S.L., and Evans,R.M. (1997). Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. *Cell* 89, 373-380.
- Oakley,B.R., Oakley,C.E., Yoon,Y., and Jung,M.K. (1990). Gamma-tubulin is a component of the spindle pole body that is essential for microtubule function in *Aspergillus nidulans*. *Cell* 61, 1289-1301.
- Oakley,C.E. and Oakley,B.R. (1989). Identification of gamma-tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by mipA gene of *Aspergillus nidulans*. *Nature* 338, 662-664.
- Oegema,K., Wiese,C., Martin,O.C., Milligan,R.A., Iwamatsu,A., Mitchison,T.J., and Zheng,Y. (1999). Characterization of two related *Drosophila* gamma-tubulin complexes that differ in their ability to nucleate microtubules. *J. Cell Biol.* 144, 721-733.
- Ogryzko,V.V., Schiltz,R.L., Russanova,V., Howard,B.H., and Nakatani,Y. (1996). The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* 87, 953-959.
- Ohkura,H., Hagan,I.M., and Glover,D.M. (1995). The conserved *Schizosaccharomyces pombe* kinase plo1, required to form a bipolar spindle, the actin ring, and septum, can drive septum formation in G1 and G2 cells. *Genes Dev.* 9, 1059-1073.
- Onate,S.A., Tsai,S.Y., Tsai,M.J., and O'Malley,B.W. (1995). Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* 270, 1354-1357.
- Orti,E., Bodwell,J.E., and Munck,A. (1992). Phosphorylation of steroid hormone receptors. *Endocr. Rev.* 13, 105-128.
- Palacios,M.J., Joshi,H.C., Simerly,C., and Schatten,G. (1993). Gamma-tubulin reorganization during mouse fertilization and early development. *J. Cell Sci.* 104 (Pt 2), 383-389.
- Palermo,G.D., Colombero,L.T., and Rosenwaks,Z. (1997). The human sperm centrosome is responsible for normal syngamy and early embryonic development. *Rev. Reprod.* 2, 19-27.
- Pazin,M.J., Bhargava,P., Geiduschek,E.P., and Kadonaga,J.T. (1997). Nucleosome mobility and the maintenance of nucleosome positioning. *Science* 276, 809-812.
- Peterson,C.L. and Tamkun,J.W. (1995). The SWI-SNF complex: a chromatin remodeling machine? *Trends Biochem. Sci.* 20, 143-146.
- Pfützner,E., Sak,A., Ulber,V., Ryffel,G.U., and Klein-Hitpass,L. (1993). Recombinant activation domains of virion protein 16 and human estrogen receptor generate transcriptional interference in vitro by distinct mechanisms. *Mol. Endocrinol.* 7, 1061-1071.
- Pickett-Heaps,J. (1971). The autonomy of the centriole: fact or fallacy? *Cytobios* 3, 205-214

- Piel,M., Meyer,P., Khodjakov,A., Rieder,C.L., and Bornens,M. (2000). The respective contributions of the mother and daughter centrioles to centrosome activity and behavior in vertebrate cells. *J. Cell Biol.* 149, 317-330.
- Pihan,G.A., Purohit,A., Wallace,J., Knecht,H., Woda,B., Quesenberry,P., and Doxsey,S.J. (1998). Centrosome defects and genetic instability in malignant tumors. *Cancer Res.* 58, 3974-3985.
- Pratt,W.B., Jolly,D.J., Pratt,D.V., Hollenberg,S.M., Giguere,V., Cadepond,F.M., Schweizer-Groyer,G., Catelli,M.G., Evans,R.M., and Baulieu,E.E. (1988). A region in the steroid binding domain determines formation of the non- DNA-binding, 9 S glucocorticoid receptor complex. *J. Biol. Chem.* 263, 267-273.
- Rachez,C., Suldan,Z., Ward,J., Chang,C.P., Burakov,D., Erdjument-Bromage,H., Tempst,P., and Freedman,L.P. (1998). A novel protein complex that interacts with the vitamin D3 receptor in a ligand-dependent manner and enhances VDR transactivation in a cell- free system. *Genes Dev.* 12, 1787-1800.
- Rachez,C., Suldan,Z., Ward,J., Chang,C.P., Burakov,D., Erdjument-Bromage,H., Tempst,P., and Freedman,L.P. (1998). A novel protein complex that interacts with the vitamin D3 receptor in a ligand-dependent manner and enhances VDR transactivation in a cell- free system. *Genes Dev.* 12, 1787-1800.
- Rachez,C., Lemon,B.D., Suldan,Z., Bromleigh,V., Gamble,M., Näär,A.M., Erdjument-Bromage,H., Tempst,P., and Freedman,L.P. (1999). Ligand-dependent transcription activation by nuclear receptors requires the DRIP complex. *Nature* 398, 824-828.
- Raff,J.W., Kellogg,D.R., and Alberts,B.M. (1993). Drosophila gamma-tubulin is part of a complex containing two previously identified centrosomal MAPs. *J. Cell Biol.* 121, 823-835.
- Ramakrishnan,V., Finch,J.T., Graziano,V., Lee,P.L., and Sweet,R.M. (1993). Crystal structure of globular domain of histone H5 and its implications for nucleosome binding. *Nature* 362, 219-223.
- Ranish,J.A., Yudkovsky,N., and Hahn,S. (1999). Intermediates in formation and activity of the RNA polymerase II preinitiation complex: holoenzyme recruitment and a postrecruitment role for the TATA box and TFIIB. *Genes Dev.* 13, 49-63.
- Riehemann,K. and Sorg,C. (1993). Sequence homologies between four cytoskeleton-associated proteins. *Trends Biochem. Sci.* 18, 82-83.
- Roeder,R.G., Schwartz,L.B., and Sklar,V.E. (1976). Function, structure, and regulation of eukaryotic nuclear RNA polymerases. *Symp. Soc. Dev. Biol.* 29-52.
- Roeder,R.G. (1996). The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends. Biochem. Sci.* 21, 327-335.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sathananthan,A.H., Tatham,B., Dharmawardena,V., Grills,B., Lewis,I., and Trounson,A. (1997). inheritance of sperm centrioles and centrosomes in bovine embryos. *Arch. Androl* 38, 37-48.

- Schatten,H., Walter,M., Biessmann,H., and Schatten,G. (1992). Activation of maternal centrosomes in unfertilized sea urchin eggs. *Cell Motil. Cytoskeleton* 23, 61-70.
- Schmidt,P.H., Dransfield,D.T., Claudio,J.O., Hawley,R.G., Trotter,K.W., Milgram,S.L., and Goldenring,J.R. (1999). AKAP350, a multiply spliced protein kinase A-anchoring protein associated with centrosomes. *J. Biol. Chem.* 274, 3055-3066.
- Schnackenberg,B.J., Khodjakov,A., Rieder,C.L., and Palazzo,R.E. (1998). The disassembly and reassembly of functional centrosomes in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 9295-9300.
- Schwerk, C. (1996). Identifizierung von Interaktionspartner bei der Transaktivierung durch Kernrezeptoren. Dissertation Universität-GH-Essen
- Schwerk,C., Klotzbucher,M., Sachs,M., Ulber,V., and Klein-Hitpass,L. (1995). Identification of a transactivation function in the progesterone receptor that interacts with the TAFII110 subunit of the TFIID complex. *J. Biol. Chem.* 270, 21331-21338.
- Sheridan,P.L., Evans,R.M., and Horwitz,K.B. (1989). Phosphotryptic peptide analysis of human progesterone receptor. New phosphorylated sites formed in nuclei after hormone treatment. *J. Biol. Chem.* 264, 6520-6528.
- Sherline,P. and Mascardo,R.N. (1982). Epidermal growth factor induces rapid centrosomal separation in HeLa and 3T3 cells. *J. Cell Biol.* 93, 507-512.
- Sherline,P. and Mascardo,R.N. (1984). Co-ordinate control of centrosomal separation and DNA synthesis by growth regulators. *Exp. Cell Res.* 153, 109-120.
- Simerly,C., Wu,G.J., Zoran,S., Ord,T., Rawlins,R., Jones,J., Navara,C., Gerrity,M., Rinehart,J., and Binor,Z. (1995). The paternal inheritance of the centrosome, the cell's microtubule-organizing center, in humans, and the implications for infertility. *Nat. Med.* 1, 47-52.
- Sluder,G. and Hinchcliffe,E.H. (1998). The apparent linkage between centriole replication and the S phase of the cell cycle. *Cell Biol. Int.* 22, 3-5.
- Sluder,G. and Hinchcliffe,E.H. (2000). The coordination of centrosome reproduction with nuclear events during the cell cycle. *Curr. Top. Dev. Biol.* 49, 267-289.
- Smith,D.F. and Toft,D.O. (1993). Steroid receptors and their associated proteins. *Mol. Endocrinol.* 7, 4-11.
- Spencer,T.E., Jenster,G., Burcin,M.M., Allis,C.D., Zhou,J., Mizzen,C.A., McKenna,N.J., Onate,S.A., Tsai,S.Y., Tsai,M.J., and O'Malley,B.W. (1997). Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature* 389, 194-198.
- Staynov,D.Z. and Crane-Robinson,C. (1988). Footprinting of linker histones H5 and H1 on the nucleosome. *EMBO J.* 7, 3685-3691.
- Stearns,T. and Kirschner,M. (1994). In vitro reconstitution of centrosome assembly and function: the central role of gamma-tubulin. *Cell* 76, 623-637.

- Strahle,U., Klock,G., and Schutz,G. (1987). A DNA sequence of 15 base pairs is sufficient to mediate both glucocorticoid and progesterone induction of gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 7871-7875.
- Stringer,K.F., Ingles,C.J., and Greenblatt,J. (1990). Direct and selective binding of an acidic transcriptional activation domain to the TATA-box factor TFIID. *Nature* 345, 783-786.
- Struhl,K. (1995). Yeast transcriptional regulatory mechanisms. *Annu. Rev. Genet.* 29, 651-674.
- Suen,C.S., Berrodin,T.J., Mastroeni,R., Cheskis,B.J., Lyttle,C.R., and Frail,D.E. (1998). A transcriptional coactivator, steroid receptor coactivator-3, selectively augments steroid receptor transcriptional activity. *J. Biol. Chem.* 273, 27645-27653.
- Szollosi,A., Ris,H., Szollosi,D., and Debec,A. (1986). A centriole-free *Drosophila* cell line. A high voltage EM study. *Eur. J. Cell Biol.* 40, 100-104.
- Szollosi,D., Calarco,P., and Donahue,R.P. (1972). Absence of centrioles in the first and second meiotic spindles of mouse oocytes. *J. Cell Sci.* 11, 521-541.
- Taillon,B.E., Adler,S.A., Suhan,J.P., and Jarvik,J.W. (1992). Mutational analysis of centrin: an EF-hand protein associated with three distinct contractile fibers in the basal body apparatus of *Chlamydomonas*. *J. Cell Biol.* 119, 1613-1624.
- Takahashi,M., Shibata,H., Shimakawa,M., Miyamoto,M., Mukai,H., and Ono,Y. (1999). Characterization of a novel giant scaffolding protein, CG-NAP, that anchors multiple signaling enzymes to centrosome and the golgi apparatus. *J. Biol. Chem.* 274, 17267-17274.
- Takeshita,A., Yen,P.M., Misiti,S., Cardona,G.R., Liu,Y., and Chin,W.W. (1996). Molecular cloning and properties of a full-length putative thyroid hormone receptor coactivator. *Endocrinology* 137, 3594-3597.
- Tanenbaum,D.M., Wang,Y., Williams,S.P., and Sigler,P.B. (1998). Crystallographic comparison of the estrogen and progesterone receptor's ligand binding domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 5998-6003.
- Tanese,N. and Tjian,R. (1993). Coactivators and TAFs: a new class of eukaryotic transcription factors that connect activators to the basal machinery. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 58, 179-185.
- Tassin,A.M., Celati,C., Moudjou,M., and Bornens,M. (1998). Characterization of the human homologue of the yeast spc98p and its association with gamma-tubulin. *J. Cell Biol.* 141, 689-701.
- Thut,C.J., Chen,J.L., Klemm,R., and Tjian,R. (1995). p53 transcriptional activation mediated by coactivators TAFII40 and TAFII60. *Science* 267, 100-104.
- Tjian,R. and Maniatis,T. (1994). Transcriptional activation: a complex puzzle with few easy pieces. *Cell* 77, 5-8.
- Torchia,J., Rose,D.W., Inostroza,J., Kamei,Y., Westin,S., Glass,C.K., and Rosenfeld,M.G. (1997). The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear- receptor function. *Nature* 387, 677-684.

- Truss,M., Bartsch,J., Schelbert,A., Hache,R.J., and Beato,M. (1995). Hormone induces binding of receptors and transcription factors to a rearranged nucleosome on the MMTV promoter in vivo. *EMBO J.* 14, 1737-1751.
- Tsai,M.J. and O'Malley,B.W. (1994). Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu. Rev. Biochem.* 63, 451-486.
- Tsai,S.Y., Srinivasan,G., Allan,G.F., Thompson,E.B., O'Malley,B.W., and Tsai,M.J. (1990). Recombinant human glucocorticoid receptor induces transcription of hormone response genes in vitro. *J. Biol. Chem.* 265, 17055-17061.
- Tsukiyama,T. and Wu,C. (1995). Purification and properties of an ATP-dependent nucleosome remodeling factor. *Cell* 83, 1011-1020.
- Valetti,C., Wetzel,D.M., Schrader,M., Hasbani,M.J., Gill,S.R., Kreis,T.E., and Schroer,T.A. (1999). Role of dynactin in endocytic traffic: effects of dynamitin overexpression and colocalization with CLIP-170. *Mol. Biol. Cell* 10, 4107-4120.
- Van Dyke,M.W., Roeder,R.G., and Sawadogo,M. (1988). Physical analysis of transcription preinitiation complex assembly on a class II gene promoter. *Science* 241, 1335-1338.
- Varga-Weisz,P.D., Blank,T.A., and Becker,P.B. (1995). Energy-dependent chromatin accessibility and nucleosome mobility in a cell-free system. *EMBO J.* 14, 2209-2216.
- Varga-Weisz,P.D., Wilm,M., Bonte,E., Dumas,K., Mann,M., and Becker,P.B. (1997). Chromatin-remodelling factor CHRAC contains the ATPases ISWI and topoisomerase II. *Nature* 388, 598-602.
- Vaughan,K.T., Tynan,S.H., Faulkner,N.E., Echeverri,C.J., and Vallee,R.B. (1999). Colocalization of cytoplasmic dynein with dynactin and CLIP-170 at microtubule distal ends. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 10), 1437-1447.
- Verrijzer,C.P. and Tjian,R. (1996). TAFs mediate transcriptional activation and promoter selectivity. *Trends Biochem. Sci.* 21, 338-342.
- Verrijzer,C.P., Yokomori,K., Chen,J.L., and Tjian,R. (1994). *Drosophila* TAFII150: similarity to yeast gene TSM-1 and specific binding to core promoter DNA. *Science* 264, 933-941.
- Voegel,J.J., Heine,M.J., Zechel,C., Chambon,P., and Gronemeyer,H. (1996). TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand- dependent activation function AF-2 of nuclear receptors. *EMBO J.* 15, 3667-3675.
- Voegel,J.J., Heine,M.S., Tini,M., Vivat,V., Chambon,P., and Gronemeyer,H. (1998). The coactivator TIF2 contains three nuclear receptor-binding motifs and mediates transactivation through CBP binding-dependent and -independent pathways [In Process Citation]. *EMBO J.* 17, 507-519.
- Vogel,J.M., Stearns,T., Rieder,C.L., and Palazzo,R.E. (1997). Centrosomes isolated from *Spisula solidissima* oocytes contain rings and an unusual stoichiometric ratio of alpha/beta tubulin. *J. Cell Biol.* 137, 193-202.

- von der Ahe,D., Janich,S., Scheidereit,C., Renkawitz,R., Schutz,G., and Beato,M. (1985). Glucocorticoid and progesterone receptors bind to the same sites in two hormonally regulated promoters. *Nature* 313, 706-709.
- Watanabe,T.K., Shimizu,F., Nagata,M., Kawai,A., Fujiwara,T., Nakamura,Y., Takahashi,E., and Hirai,Y. (1996). Cloning, expression, and mapping of CKAPI, which encodes a putative cytoskeleton-associated protein containing a CAP-GLY domain. *Cytogenet. Cell Genet.* 72, 208-211.
- Weil,P.A., Luse,D.S., Segall,J., and Roeder,R.G. (1979). Selective and accurate initiation of transcription at the Ad2 major late promotor in a soluble system dependent on purified RNA polymerase II and DNA. *Cell* 18, 469-484.
- Witczak,O., Skalhegg,B.S., Keryer,G., Bornens,M., Tasken,K., Jahnsen,T., and Orstavik,S. (1999). Cloning and characterization of a cDNA encoding an A-kinase anchoring protein located in the centrosome, AKAP450. *EMBO J.* 18, 1858-1868.
- Wolffe,A.P., Wong,J., and Pruss,D. (1997). Activators and repressors: making use of chromatin to regulate transcription. *Genes Cells* 2, 291-302.
- Wolff,B., Sanglier,J.J., and Wang,Y. (1997). Leptomycin B is an inhibitor of nuclear export: inhibition of nucleo- cytoplasmic translocation of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Rev protein and Rev-dependent mRNA. *Chem. Biol.* 4, 139-147.
- Woolley,D.M. and Fawcett,D.W. (1973). The degeneration and disappearance of the centrioles during the development of the rat spermatozoon. *Anat. Rec.* 177, 289-301.
- Workman,J.L. and Kingston,R.E. (1998). Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 545-579.
- Woychik,N.A. and Young,R.A. (1990). RNA polymerase II: subunit structure and function. *Trends Biochem. Sci.* 15, 347-351.
- Wright,R.L., Salisbury,J., and Jarvik,J.W. (1985). A nucleus-basal body connector in *Chlamydomonas reinhardtii* that may function in basal body localization or segregation. *J. Cell Biol.* 101, 1903-1912.
- Xiao,H., Pearson,A., Coulombe,B., Truant,R., Zhang,S., Regier,J.L., Triezenberg,S.J., Reinberg,D., Flores,O., Ingles,C.J., and . (1994). Binding of basal transcription factor TFIIF to the acidic activation domains of VP16 and p53. *Mol. Cell Biol.* 14, 7013-7024.
- Yang,X.J., Ogryzko,V.V., Nishikawa,J., Howard,B.H., and Nakatani,Y. (1996). A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature* 382, 319-324.
- Young,A., Dictenberg,J.B., Purohit,A., Tuft,R., and Doxsey,S.J. (2000). Cytoplasmic dynein-mediated assembly of pericentrin and gamma tubulin onto centrosomes. *Mol. Biol. Cell* 11, 2047-2056.
- Yuan,C.X., Ito,M., Fondell,J.D., Fu,Z.Y., and Roeder,R.G. (1998). The TRAP220 component of a thyroid hormone rece. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 7939-7944.

- Zamboni L., and Mastroianni, L. (1966). Electron microscopic studies of rabbit ova. *J. Ultrastruc. Res* 169, 155-172
- Zamboni,L. and Stefanini,M. (1971). The fine structure of the neck of mammalian spermatozoa. *Anat. Rec.* 169, 155-172.
- Zapp,D., Bartkowski,S., Holewa,B., Zoidl,C., Klein-Hitpass,L., and Ryffel,G.U. (1993). Elements and factors involved in tissue-specific and embryonic expression of the liver transcription factor LFB1 in *Xenopus laevis*. *Mol. Cell Biol.* 13, 6416-6426.
- Zawel,L. and Reinberg,D. (1993). Initiation of transcription by RNA polymerase II: a multi-step process. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 44, 67-108.
- Zeiner,M. and Gehring,U. (1995). A protein that interacts with members of the nuclear hormone receptor family: identification and cDNA cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 11465-11469.
- Zhang,J. and Fondell,J.D. (1999). Identification of mouse TRAP100: a transcriptional coregulatory factor for thyroid hormone and vitamin D receptors. *Mol. Endocrinol.* 13, 1130-1140.
- Zheng,Y., Wong,M.L., Alberts,B., and Mitchison,T. (1995). Nucleation of microtubule assembly by a gamma-tubulin-containing ring complex. *Nature* 378, 578-583.

7 Anhang

CCCGGAG CCGGTGCGAG GAGGGCACCC GGTGCGTCCC CGGAGCGGGG																				-121
AGGCCAGGCC GGGCAACCCT GGGGCCGGTC GGGGCCGGCGT CACTGCACCC TCCGCCAGGC																				-61
TCCGCGGGAT GCACCGTGGT AGCCGAGGGC GGAGGCGACA CTCTCAGGTA AATTGGCAGG																				-1
atg	agg	agc	agc	aaa	tca	aaa	gag	gtg	cct	tta	cca	aat	cca	agg	aac	tct	caa	agc	aag	60
M	R	S	S	K	S	K	E	V	P	L	P	N	P	R	N	S	Q	S	K	20
gat	act	gtt	caa	gca	gat	ata	acc	aca	tcg	tgg	gat	gca	ctt	tct	caa	acc	aag	gct	gct	120
D	T	V	Q	A	D	I	T	T	S	W	D	A	L	S	Q	T	K	A	A	40
ctg	aga	cac	att	gaa	aat	aaa	tta	gaa	gta	gcc	cct	aca	agt	aca	gct	gtg	tgt	gat	tct	180
L	R	H	I	E	N	K	L	E	V	A	P	T	S	T	A	V	C	D	S	60
gtc	atg	gat	acc	aag	aag	tct	tct	aca	agt	gct	act	cga	aaa	ata	agt	aga	aaa	gat	ggg	240
V	M	D	T	K	K	S	S	T	S	A	T	R	K	I	S	R	K	D	G	80
aga	tac	ctg	gat	gat	tct	tgg	gtt	aat	gct	cca	atc	tcc	aaa	tcc	act	aaa	tca	cga	aaa	300
R	Y	L	D	D	S	W	V	N	A	P	I	S	K	S	T	K	S	R	K	100
gag	aaa	tct	cgt	agt	cct	ctc	agg	gcc	acc	acc	ctg	gag	ggg	aat	gtg	aag	aaa	aat	aat	360
E	K	S	R	S	P	L	R	A	T	T	L	E	G	N	V	K	K	N	N	120
cgt	gtg	gaa	ttt	cgt	gaa	cct	ttg	gtt	tct	tat	agg	gaa	atc	cat	ggg	gca	cct	tcc	aat	420
R	V	E	F	R	E	P	L	V	S	Y	R	E	I	H	G	A	P	S	N	140
ttc	agt	tcc	agc	cat	ctg	gaa	tca	aag	cac	gta	tac	tgt	gta	gat	gtt	aat	gaa	gaa	aag	480
F	S	S	S	H	L	E	S	K	H	V	Y	C	V	D	V	N	E	E	K	160
act	gag	agc	ggg	aac	tgg	atg	ata	ggc	agt	cga	gaa	gaa	cgg	aat	ata	cgg	agc	tgt	gat	540
T	E	S	G	N	W	M	I	G	S	R	E	E	R	N	I	R	S	C	D	180
ttt	gag	agc	tcc	caa	tca	tct	gtc	atc	aat	gat	aca	gtt	gtt	agg	ttt	tta	aat	gat	cga	600
F	E	S	S	Q	S	S	V	I	N	D	T	V	V	R	F	L	N	D	R	200
cca	gca	att	gat	gca	ttg	caa	aat	tct	gaa	tgt	ttg	att	agg	atg	gga	gct	tct	atg	aga	660
P	A	I	D	A	L	Q	N	S	E	C	L	I	R	M	G	A	S	M	R	220
act	gag	gaa	gaa	atg	cct	aac	aga	aca	aaa	gga	agt	gag	aat	aat	ttg	aag	ctt	tct	gtg	720
T	E	E	E	M	P	N	R	T	K	G	S	E	N	N	L	K	L	S	V	240
aat	aac	atg	gcc	cat	gat	act	gat	cca	aaa	gcg	tta	cga	cta	act	gac	tct	tct	cca	tcc	780
N	N	M	A	H	D	T	D	P	K	A	L	R	L	T	D	S	S	P	S	260
tct	act	agt	act	tct	aat	tcc	caa	aga	tta	gat	att	cta	aag	cgg	cga	caa	cat	gat	gtc	840
S	T	S	T	S	N	S	Q	R	L	D	I	L	K	R	R	Q	H	D	V	280
aaa	ctg	gaa	aaa	ctt	aag	gaa	cgg	att	aga	aaa	cag	tgg	gaa	cac	tca	gaa	gaa	aca	aat	900
K	L	E	K	L	K	E	R	I	R	K	Q	W	E	H	S	E	E	T	N	300
ggc	cgg	ggc	cag	aag	ctg	ggg	cat	att	gac	cat	cca	gta	atg	gtt	gtt	aat	gtt	gat	aac	960
G	R	G	Q	K	L	G	H	I	D	H	P	V	M	V	V	N	V	D	N	320
tca	gta	aca	gca	aaa	gtc	aga	aaa	gtg	gca	aca	gca	cca	cct	gct	cca	gca	tat	aaa	ggg	1020
S	V	T	A	K	V	R	K	V	A	T	A	P	P	A	P	A	Y	K	G	340
ttc	aac	cct	tca	gag	acc	aag	att	cga	aca	cct	gat	ggg	aaa	gtg	tgg	cag	gag	gct	gag	1080
F	N	P	S	E	T	K	I	R	T	P	D	G	K	V	W	Q	E	A	E	360
ttt	caa	aac	atg	agt	aga	gaa	ctg	tat	cga	gat	tta	gca	ctt	cac	ttt	gca	gat	gat	att	1140
F	Q	N	M	S	R	E	L	Y	R	D	L	A	L	H	F	A	D	D	I	380
tct	ata	aag	gag	aaa	cct	gct	gaa	aaa	agt	aaa	gag	aag	aaa	gta	gtc	aag	cca	gta	cga	1200
S	I	K	E	K	P	A	E	K	S	K	E	K	K	V	V	K	P	V	R	400
aaa	gtc	caa	aaa	gta	gca	cag	tta	tca	agt	aca	gaa	tgc	aga	aca	ggg	agt	agt	cat	ctt	1260
K	V	Q	K	V	A	Q	L	S	S	T	E	C	R	T	G	S	S	H	L	420

ata	agt	aca	tct	tct	tgg	cga	gat	gga	caa	aaa	tta	gta	aag	aag	att	ctg	gga	cct	gct	1320
I	S	T	S	S	W	R	D	G	Q	K	L	V	K	K	I	L	G	P	A	440
ccc	aga	atg	gag	cca	aaa	gag	caa	aga	aca	gca	tca	agt	gac	aga	ggg	gga	aga	aga	aga	1380
P	R	M	E	P	K	E	Q	R	T	A	S	S	D	R	G	G	R	R	R	460
act	gct	aaa	tct	ggg	ggg	cac	att	gga	aga	gca	gaa	tct	gat	ccc	agg	ttg	gac	ggt	tta	1440
T	A	K	S	G	G	H	I	G	R	A	E	S	D	P	R	L	D	V	L	480
cat	aga	cat	ctt	caa	aga	aac	tca	gaa	cgt	tcg	aga	agt	aaa	tct	cgg	tct	gaa	aat	aat	1500
H	R	H	L	Q	R	N	S	E	R	S	R	S	K	S	R	S	E	N	N	500
ata	aag	aaa	cta	gct	tca	tct	ctt	cca	gat	aat	aag	cag	gag	gaa	aat	act	gcc	tta	aat	1560
I	K	K	L	A	S	S	L	P	D	N	K	Q	E	E	N	T	A	L	N	520
aag	gac	ttt	tta	cct	att	gaa	att	cgt	ggc	att	ctt	gat	gac	cta	cag	ctg	gat	tct	aca	1620
K	D	F	L	P	I	E	I	R	G	I	L	D	D	L	Q	L	D	S	T	540
gct	cac	act	gca	aag	caa	gat	act	gta	gag	tta	cag	aac	cag	aag	tca	tca	gca	cca	gta	1680
A	H	T	A	K	Q	D	T	V	E	L	Q	N	Q	K	S	S	A	P	V	560
cat	gct	cct	agg	agt	cac	agc	cca	gta	aaa	aga	aaa	cct	gac	aaa	ata	aca	gct	aat	gaa	1740
H	A	P	R	S	H	S	P	V	K	R	K	P	D	K	I	T	A	N	E	580
gat	ccc	cct	ggt	att	tcc	aaa	agg	cgc	cac	tat	gac	aca	gat	gag	gta	cga	cag	tac	att	1800
D	P	P	V	I	S	K	R	R	H	Y	D	T	D	E	V	R	Q	Y	I	600
ggt	agg	cag	cag	gag	gaa	agg	aag	aga	aag	caa	aat	gaa	gag	aag	aag	gct	caa	aag	gag	1860
V	R	Q	Q	E	E	R	K	R	K	Q	N	E	E	K	K	A	Q	K	E	620
gct	aca	gaa	cag	aaa	aac	aaa	cga	tta	caa	gag	ctc	tac	cgg	aag	cag	aag	gaa	gcc	ttt	1920
A	T	E	Q	K	N	K	R	L	Q	E	L	Y	R	K	Q	K	E	A	F	640
act	aaa	gta	aaa	aat	gtc	cct	cct	tct	gag	cca	tca	gca	act	agg	cga	cta	cag	gaa	act	1980
T	K	V	K	N	V	P	P	S	E	P	S	A	T	R	R	L	Q	E	T	660
tac	tcc	aaa	ttg	cta	cta	gaa	aag	acc	ttg	ctt	gaa	gag	cca	tct	cat	caa	cat	gtt	acg	2040
Y	S	K	L	L	L	E	K	T	L	L	E	E	P	S	H	Q	H	V	T	680
cag	gaa	aca	cag	gcc	aaa	cca	ggg	tat	cag	cca	tct	gga	gaa	tct	gac	aaa	gaa	aac	aaa	2100
Q	E	T	Q	A	K	P	G	Y	Q	P	S	G	E	S	D	K	E	N	K	700
gta	cag	gaa	cgt	ccc	cca	agt	gca	tct	tcc	agt	agt	gac	atg	tct	ctc	tca	gaa	cct	cca	2160
V	Q	E	R	P	P	S	A	S	S	S	S	D	M	S	L	S	E	P	P	720
cag	cct	ctt	gca	aga	aaa	gac	ttg	atg	gaa	tct	aca	tgg	atg	cag	cct	gaa	aga	ttg	agc	2220
Q	P	L	A	R	K	D	L	M	E	S	T	W	M	Q	P	E	R	L	S	740
cca	caa	gtt	cac	cat	tct	caa	cca	cag	cct	ttt	gct	gga	aca	gct	gga	agt	tta	ctc	tcc	2280
P	Q	V	H	H	S	Q	P	Q	P	F	A	G	T	A	G	S	L	L	S	760
cat	ctc	ttg	agt	tta	gag	cat	gta	gga	att	ttg	cat	aag	gat	ttt	gaa	tct	att	tta	cca	2340
H	L	L	S	L	E	H	V	G	I	L	H	K	D	F	E	S	I	L	P	780
acc	agg	aag	aat	cat	aat	atg	gct	tca	agg	cca	tta	act	ttt	aca	cct	caa	cca	tat	gtg	2400
T	R	K	N	H	N	M	A	S	R	P	L	T	F	T	P	Q	P	Y	V	800
acc	tca	cca	gct	gct	tat	aca	gat	gcc	ttg	tta	aaa	cct	agt	gcc	agc	caa	tat	aag	agt	2460
T	S	P	A	A	Y	T	D	A	L	L	K	P	S	A	S	Q	Y	K	S	820
aaa	ctg	gat	cgt	att	gaa	gcc	ttg	aaa	gca	aca	gct	gct	tct	ttg	tcc	agc	aga	att	gaa	2520
K	L	D	R	I	E	A	L	K	A	T	A	A	S	L	S	S	R	I	E	840
agt	gaa	gcc	aag	aaa	tta	gct	ggg	gcc	agc	att	aac	tat	ggg	tca	gca	tgg	aac	act	gag	2580
S	E	A	K	K	L	A	G	A	S	I	N	Y	G	S	A	W	N	T	E	860
tat	gat	gtg	cag	cag	gca	cct	caa	gaa	gat	gga	cct	tgg	acc	aag	gct	gta	act	cca	cct	2640
Y	D	V	Q	Q	A	P	Q	E	D	G	P	W	T	K	A	V	T	P	P	880
gtg	aaa	gat	gat	aat	gaa	gat	gtt	ttc	tct	gcc	aga	att	cag	aag	atg	ctg	gga	agc	tgt	2700
V	K	D	D	N	E	D	V	F	S	A	R	I	Q	K	M	L	G	S	C	900

gta	tct	cat	gca	act	ttt	gat	gat	gat	ctt	cct	ggt	gta	ggc	aat	ctt	agt	gaa	ttt	aaa	2760
V	S	H	A	T	F	D	D	D	L	P	G	V	G	N	L	S	E	F	K	920
aag	ctt	cct	gag	atg	ata	aga	cca	cag	agt	gcc	ata	tca	agc	ttt	aga	gtg	aga	tcc	cct	2820
K	L	P	E	M	I	R	P	Q	S	A	I	S	S	F	R	V	R	S	P	940
ggt	ccc	aaa	cca	caa	ggg	cta	ctg	gca	cag	tta	tgt	aaa	agg	cag	act	gac	tct	tct	agc	2880
G	P	K	P	Q	G	L	L	A	Q	L	C	K	R	Q	T	D	S	S	S	960
tct	gat	atg	caa	gcc	tgt	tct	caa	gac	aaa	gcc	aaa	ata	tct	ctt	ggt	tcc	agc	ata	gat	2940
S	D	M	Q	A	C	S	Q	D	K	A	K	I	S	L	G	S	S	I	D	980
tca	gtc	agt	gaa	ggg	cct	ctt	ctt	agt	gag	ggg	agt	ctc	tct	gaa	gaa	gag	gga	gac	cag	3000
S	V	S	E	G	P	L	L	S	E	G	S	L	S	E	E	E	G	D	Q	1000
gat	gga	cag	ccc	ctt	ttg	aaa	gta	gca	gaa	att	tta	aaa	gaa	aag	gaa	ttt	tgt	cct	gga	3060
D	G	Q	P	L	L	K	V	A	E	I	L	K	E	K	E	F	C	P	G	1020
gaa	aga	aat	agt	tat	gaa	ccc	atc	aaa	gag	ttt	cag	aaa	gaa	gct	gaa	aaa	ttc	ttg	cca	3120
E	R	N	S	Y	E	P	I	K	E	F	Q	K	E	A	E	K	F	L	P	1040
ctt	ttt	ggg	cac	ata	ggt	ggt	aca	caa	agc	aaa	gga	cca	tgg	gaa	gaa	ttg	gca	aag	gga	3180
L	F	G	H	I	G	G	T	Q	S	K	G	P	W	E	E	L	A	K	G	1060
→*	agt	cca	cat	agc	gtc	att	aat	att	ttt	aca	aaa	tcc	tat	cag	tta	tat	gga	aaa	ggg	3240
S	P	H	S	V	I	N	I	F	T	K	S	Y	Q	L	Y	G	K	G	F	1080
gaa	gac	aag	ttg	gac	aga	gga	aca	tca	aca	tca	cgg	cct	ttg	aat	gcc	acc	gca	act	cct	3300
E	D	K	L	D	R	G	T	S	T	S	R	P	L	N	A	T	A	T	P	1100
cta	agt	ggt	gtt	tca	tat	gaa	gat	gat	ttt	gtc	tcc	tct	cca	ggg	act	ggg	act	tcg	aca	3360
L	S	G	V	S	Y	E	D	D	F	V	S	S	P	G	T	G	T	S	T	1120
gaa	aaa	aaa	tca	act	ctt	gaa	cct	cat	agc	act	tta	agc	cct	cag	gag	gac	cat	tct	aac	3420
E	K	K	S	T	L	E	P	H	S	T	L	S	P	Q	E	D	H	S	N	1140
aga	aag	tct	gcc	tat	gat	cct	tcc	tct	gtg	gat	gtt	acc	tcc	cag	cat	tca	tca	gga	gcc	3480
R	K	S	A	Y	D	P	S	S	V	D	V	T	S	Q	H	S	S	G	A	1160
cag	tct	gct	gca	tcg	tct	cgt	tca	tct	act	tct	tct	aaa	gga	aag	aaa	gga	aaa	aag	gaa	3540
Q	S	A	A	S	S	R	S	S	T	S	S	K	G	K	K	G	K	K	E	1180
aag	aca	gaa	tgg	ttg	gat	tca	ttc	act	gga	aat	gtt	cag	aac	tca	ctt	ctt	gat	gag	gaa	3600
K	T	E	W	L	D	S	F	T	G	N	V	Q	N	S	L	L	D	E	E	1200
aaa	gca	gaa	cgt	ggc	tcc	cat	caa	gga	aag	aaa	tct	ggg	acc	agc	agc	aaa	ctt	tct	gtt	3660
K	A	E	R	G	S	H	Q	G	K	K	S	G	T	S	S	K	L	S	V	1220
aaa	gat	ttt	gag	cag	act	ctt	gat	aca	gat	agc	act	ttg	gag	gat	ctt	tct	gga	cat	tct	3720
K	D	F	E	Q	T	L	D	T	D	S	T	L	E	D	L	S	G	H	S	1240
gtg	agt	gtc	tca	tca	gat	aag	gga	aga	tct	cag	aaa	act	cca	act	tct	ccc	ctg	tca	cca	3780
V	S	V	S	S	D	K	G	R	S	Q	K	T	P	T	S	P	L	S	P	1260
agt	tcc	cag	aaa	tca	ttg	cag	ttt	gac	gtt	gca	gga	act	tct	tca	gaa	aga	tct	aag	tcg	3840
S	S	Q	K	S	L	Q	F	D	V	A	G	T	S	S	E	R	S	K	S	1280
tca	gta	atg	cct	cca	act	ata	aca	gga	ttt	aag	cct	aat	gca	cct	ctc	act	gat	ctg	aac	3900
S	V	M	P	P	T	I	T	G	F	K	P	N	A	P	L	T	D	L	N	1300
ccg	gca	gcc	agc	aga	aca	acg	aca	gag	aac	atg	gct	cca	ata	cca	ggt	tct	aag	cgc	ttt	3960
P	A	A	S	R	T	T	T	E	N	M	A	P	I	P	G	S	K	R	F	1320
tct	cct	gct	ggc	ctc	cat	cat	cgt	atg	gca	gca	gaa	ctc	agt	tat	ctg	aac	gcc	att	gag	4020
S	P	A	G	L	H	H	R	M	A	A	E	L	S	Y	L	N	A	I	E	1340
gag	tcg	gtg	cgc	caa	ctg	tca	gat	gta	gaa	aga	gtt	aga	ggc	att	tca	ctt	gct	cag	cag	4080
E	S	V	R	Q	L	S	D	V	E	R	V	R	G	I	S	L	A	Q	Q	1360

* Primer 3

* Primer 4

gag	agt	gtg	tct	cta	gct	cag	ata	ata	aag	gca	caa	cag	caa	cgc	cat	gaa	aga	gac	ttg	4140
E	S	V	S	L	A	Q	I	I	K	A	Q	Q	Q	R	H	E	R	D	L	1380
gcc	ctc	ttg	aaa	cta	aag	gct	gaa	caa	gag	gct	ctg	gag	agt	cag	aga	caa	tta	gaa	gaa	4200
A	L	L	K	L	K	A	E	Q	E	A	L	E	S	Q	R	Q	L	E	E	1400
Primer 1																				
acc	cga	aac	aaa	gca	gct	cag	gtc	cat	gca	gaa	tca	tta	cag	cag	gtg	gtt	caa	tca	caa	4260
T	R	N	K	A	A	Q	V	H	A	E	S	L	Q	Q	V	V	Q	S	Q	1420
cgg	gaa	gta	act	gaa	gtc	ctg	cag	gaa	gca	acg	tgt	aaa	ata	gca	gct	cag	cag	tca	gaa	4320
R	E	V	T	E	V	L	Q	E	A	T	C	K	I	A	A	Q	Q	S	E	1440
act	gct	cgc	ctc	acc	aca	gac	gca	gca	cgt	caa	atc	tgt	gag	atg	gca	gag	ttg	act	aga	4380
T	A	R	L	T	T	D	A	A	R	Q	I	C	E	M	A	E	L	T	R	1460
act	cat	atc	tca	gat	gct	gtc	gtg	gct	tca	gga	gct	ccc	ctt	gca	ata	ctg	tat	gac	cac	4440
T	H	I	S	D	A	V	V	A	S	G	A	P	L	A	I	L	Y	D	H	1480
caa	cgg	cag	cac	ctt	cca	gac	ttt	gtg	aaa	cag	ctg	agg	acc	aga	act	gaa	aca	gat	agg	4500
Q	R	Q	H	L	P	D	F	V	K	Q	L	R	T	R	T	E	T	D	R	1500
aaa	agt	cca	tct	gtt	tca	ctc	tct	cag	agt	aaa	gaa	ggg	acc	ctt	gac	tca	aag	cat	cag	4560
K	S	P	S	V	S	L	S	Q	S	K	E	G	T	L	D	S	K	H	Q	1520
aag	tat	tct	gct	tca	tat	gat	agt	tat	tct	gag	tct	tca	gga	tac	aag	aat	cat	gat	aga	4620
K	Y	S	A	S	Y	D	S	Y	S	E	S	S	G	Y	K	N	H	D	R	1540
aga	agt	agc	agt	ggg	agc	agc	cgc	caa	gaa	agt	cct	tca	gtt	cca	tct	tgt	aag	gaa	aat	4680
R	S	S	S	G	S	S	R	Q	E	S	P	S	V	P	S	C	K	E	N	1560
gag	aag	aaa	ctt	aat	ggg	gaa	aag	ata	gag	agt	tcc	att	gat	gaa	cag	gtt	cag	act	gct	4740
E	K	K	L	N	G	E	K	I	E	S	S	I	D	E	Q	V	Q	T	A	1580
gca	gat	gat	tct	cta	cga	agt	gat	agt	gtt	cca	tct	ctt	cct	gat	gaa	aaa	gac	tca	acg	4800
A	D	D	S	L	R	S	D	S	V	P	S	L	P	D	E	K	D	S	T	1600
tct	att	gca	aca	gaa	tat	tct	ctg	aaa	ttt	gat	gaa	tcc	atg	aca	gaa	gat	gaa	ata	gaa	4860
S	I	A	T	E	Y	S	L	K	F	D	E	S	M	T	E	D	E	I	E	1620
gaa	caa	tca	ttt	cga	tca	tta	cta	cct	tca	gag	agt	cac	cgc	aga	ttt	aac	atg	gaa	aag	4920
E	Q	S	F	R	S	L	L	P	S	E	S	H	R	R	F	N	M	E	K	1640
aga	aga	ggg	cat	cat	gat	gac	tct	gat	gaa	gaa	gct	tct	cca	gaa	aaa	act	aca	ctg	tct	4980
R	R	G	H	H	D	D	S	D	E	E	A	S	P	E	K	T	T	L	S	1660
act	gcc	aag	gaa	ctg	aac	atg	cca	ttc	tca	gga	gga	caa	gat	agc	ttt	tct	aaa	ttt	act	5040
T	A	K	E	L	N	M	P	F	S	G	G	Q	D	S	F	S	K	F	T	1680
atg	gag	atg	gtt	cga	cag	tat	atg	aaa	gag	gaa	gaa	atg	agg	gca	gct	cac	cag	tct	tca	5100
M	E	M	V	R	Q	Y	M	K	E	E	E	M	R	A	A	H	Q	S	S	1700
ctc	ctg	cgt	ctc	cgt	gaa	aag	gcc	ttg	aag	gag	aag	act	aag	gct	gaa	ttg	gcc	tggt	tta	5160
L	L	R	L	R	E	K	A	L	K	E	K	T	K	A	E	L	A	W	L	1720
gag	cat	caa	aaa	aaa	cat	cta	cga	gac	aaa	gga	gag	gat	gat	aaa	atg	ccc	cgc	ctc	cgg	5220
E	H	Q	K	K	H	L	R	D	K	G	E	D	D	K	M	P	P	L	R	1740
aag	aaa	cag	cgt	ggg	ttg	ctt	tta	agg	ttg	cag	caa	gaa	aag	gca	gaa	ata	aaa	cgt	ctt	5280
K	K	Q	R	G	L	L	L	R	L	Q	Q	E	K	A	E	I	K	R	L	1760
caa	gaa	gcc	aat	aag	gca	gct	cgg	aag	gaa	aga	cag	ctg	att	ctt	aaa	cag	cag	gag	gag	5340
Q	E	A	N	K	A	A	R	K	E	R	Q	L	I	L	K	Q	Q	E	E	1780
ata	gaa	aag	atc	cga	cag	acc	acc	ata	aaa	cta	cag	gag	aaa	ttg	aag	tct	gca	ggg	gag	5400
I	E	K	I	R	Q	T	T	I	K	L	Q	E	K	L	K	S	A	G	E	1800
agt	aaa	ttg	gac	tct	cat	agt	gat	gat	gat	aca	aag	gat	aat	aag	gca	acc	agt	cct	ggg	5460
S	K	L	D	S	H	S	D	D	D	T	K	D	N	K	A	T	S	P	G	1820
cca	act	gac	ttg	gag	acc	cgc	agt	cct	tct	ccc	att	tca	atc	tcc	agc	agt	gaa	act	agc	5520
P	T	D	L	E	T	R	S	P	S	P	I	S	I	S	S	S	E	T	S	1840

agc	att	atg	cag	aaa	ctg	aag	aaa	atg	aga	agc	cgc	atg	gat	gaa	aag	ttt	ctg	aca	aag	5580
S	I	M	Q	K	L	K	K	M	R	S	R	M	D	E	K	F	L	T	K	1860
cgg	gag	caa	aaa	tta	atg	caa	cgg	cga	caa	cat	gca	gag	gag	ctc	cta	gag	tgg	aag	cga	5640
R	E	Q	K	L	M	Q	R	R	Q	H	A	E	E	L	L	E	W	K	R	1880
cgt	tta	gat	gca	gaa	gaa	gca	gaa	att	cgt	caa	atg	gaa	aaa	caa	gct	ttg	gct	gcc	tgg	5700
R	L	D	A	E	E	A	E	I	R	Q	M	E	K	Q	A	L	A	A	W	1900
gac	aaa	gaa	tta	ata	aaa	ccc	aaa	act	cct	aag	aaa	gaa	ctg	gag	gac	cag	aga	aca	gaa	5760
D	K	E	L	I	K	P	K	T	P	K	K	E	L	E	D	Q	R	T	E	1920
cag	aaa	gaa	ata	gca	agt	gaa	gag	gaa	tct	cca	gta	cct	ctg	tac	tct	cat	cta	aac	agt	5820
Q	K	E	I	A	S	E	E	E	S	P	V	P	L	Y	S	H	L	N	S	1940
gaa	agc	tcc	att	cca	gaa	gaa	tta	ggc	agc	cct	gct	gtt	gaa	tat	gta	cca	tcc	gag	tct	5880
E	S	S	I	P	E	E	L	G	S	P	A	V	E	Y	V	P	S	E	S	1960
ata	gga	cag	gag	cag	cca	ggg	agt	cca	gat	cac	agt	ata	ctt	act	gaa	gaa	atg	att	tgt	5940
I	G	Q	E	Q	P	G	S	P	D	H	S	I	L	T	E	E	M	I	C	1980
tca	cag	gaa	cta	gaa	tct	tct	acc	tct	cct	agt	aaa	cat	tca	ctt	ccc	aaa	agc	tgc	aca	6000
S	Q	E	L	E	S	S	T	S	P	S	K	H	S	L	P	K	S	C	T	2000
tct	gtg	tca	aag	cag	gag	tct	agc	aaa	gga	agt	cat	agg	act	gga	gga	caa	tgt	cac	ctg	6060
S	V	S	K	Q	E	S	S	K	G	S	H	R	T	G	G	Q	C	H	L	2020
cct	atc	aag	tcc	cat	cag	cac	tgt	tat	agt	tgg	tca	gat	gag	tca	tta	tct	atg	aca	cag	6120
P	I	K	S	H	Q	H	C	Y	S	W	S	D	E	S	L	S	M	T	Q	2040
tca	gaa	act	aca	tct	gac	cag	agt	gat	att	gaa	ggg	agg	atc	aga	gct	ctg	aag	gat	gag	6180
S	E	T	T	S	D	Q	S	D	I	E	G	R	I	R	A	L	K	D	E	2060
ttg	cgg	aaa	aga	aaa	tca	gtt	gtg	aac	cag	ctg	aag	aag	gaa	cag	aaa	aaa	agg	caa	aag	6240
L	R	K	R	K	S	V	V	N	Q	L	K	K	E	Q	K	K	R	Q	K	2080
gaa	aga	ctg	aaa	gcc	caa	gaa	gcc	agt	ctg	atc	aag	cag	tta	gag	tca	tat	gat	gaa	ttt	6300
E	R	L	K	A	Q	E	A	S	L	I	K	Q	L	E	S	Y	D	E	F	2100
att	aag	aaa	act	gaa	gcc	gag	ctt	agc	caa	gat	ttg	gaa	aca	tca	cca	aca	gcc	aag	cct	6360
I	K	K	T	E	A	E	L	S	Q	D	L	E	T	S	P	T	A	K	P	2120
cag	att	aaa	acg	ctc	tcc	tca	gct	tct	gaa	aaa	ccc	aag	atc	aaa	ccc	ctc	aca	cca	cta	6420
Q	I	K	T	L	S	S	A	S	E	K	P	K	I	K	P	L	T	P	L	2140
cac	aga	tct	gaa	acg	gca	aag	aat	tgg	aaa	tca	cta	aca	gag	tca	gaa	cgt	tcc	aga	gga	6480
H	R	S	E	T	A	K	N	W	K	S	L	T	E	S	E	R	S	R	G	2160
tcc	ctg	gag	cct	att	gct	gaa	cat	gtt	gat	gct	tca	ctg	tct	ggg	tct	gag	aga	tca	gta	6540
S	L	E	P	I	A	E	H	V	D	A	S	L	S	G	S	E	R	S	V	2180
tca	gaa	agg	tct	tta	tct	gca	tat	gca	aag	aga	gta	aat	gaa	tgg	gac	agt	cga	aca	gaa	6600
S	E	R	S	L	S	A	Y	A	K	R	V	N	E	W	D	S	R	T	E	2200
gat	ttt	cag	acc	cca	tct	cca	gtt	ctc	aga	tca	tca	agg	aaa	atc	aga	gaa	gaa	tct	gga	6660
D	F	Q	T	P	S	P	V	L	R	S	S	R	K	I	R	E	E	S	G	2220
gat	tct	cta	gaa	aat	gta	cct	gca	tta	cat	ctt	ctc	aaa	gaa	tta	aat	gcc	act	agt	aga	6720
D	S	L	E	N	V	P	A	L	H	L	L	K	E	L	N	A	T	S	R	2240
att	ctt	gat	atg	tca	gat	ggc	aag	gtt	gga	gaa	tct	agt	aaa	aaa	tca	gaa	ata	aaa	gaa	6780
I	L	D	M	S	D	G	K	V	G	E	S	S	K	K	S	E	I	K	E	2260
ata	gag	tat	aca	aaa	ttg	aag	aag	agt	aag	att	gaa	gat	gcc	ttt	tct	aaa	gaa	ggg	aaa	6840
I	E	Y	T	K	L	K	K	S	K	I	E	D	A	F	S	K	E	G	K	2280
tct	gat	gtc	tta	ctg	aaa	tta	gtc	cta	gaa	cag	gga	gat	tca	tct	gaa	att	ctt	tca	aag	6900
S	D	V	L	L	K	L	V	L	E	Q	G	D	S	S	E	I	L	S	K	2300
aaa	gat	ctt	cct	tta	gat	tct	gaa	aat	gtt	cag	aaa	gac	cta	gtt	gga	tta	gct	att	gaa	6960
K	D	L	P	L	D	S	E	N	V	Q	K	D	L	V	G	L	A	I	E	2320

aat	ctc	cat	aaa	agt	gag	gaa	atg	ttg	aaa	gag	aga	cag	tca	gat	caa	gat	atg	aat	cat	7020
N	L	H	K	S	E	E	M	L	K	E	R	Q	S	D	Q	D	M	N	H	2340
agt	cca	aac	atc	caa	tca	gga	aaa	gac	att	cac	gaa	caa	aag	aac	aca	aag	gaa	aaa	gat	7080
S	P	N	I	Q	S	G	K	D	I	H	E	Q	K	N	T	K	E	K	D	2360
ttg	tct	tg	tca	gaa	cat	ctt	ttt	gct	cct	aaa	gag	ata	cca	tac	tct	gaa	gat	ttt	gaa	7140
L	S	W	S	E	H	L	F	A	P	K	E	I	P	Y	S	E	D	F	E	2380
gtg	tct	tct	ttc	aag	aaa	gaa	att	tca	gct	gaa	ttg	tac	aaa	gat	gat	ttt	gag	gtg	tca	7200
V	S	S	F	K	K	E	I	S	A	E	L	Y	K	D	D	F	E	V	S	2400
tct	ttg	ctg	tca	ctc	agg	aaa	gac	tct	cag	tct	tg	aga	gat	aag	cca	cag	cca	atg	agg	7260
S	L	L	S	L	R	K	D	S	Q	S	C	R	D	K	P	Q	P	M	R	2420
agc	tct	aca	agt	gga	gcc	act	agc	ttt	ggt	agt	aat	gag	gaa	atc	agt	gag	tg	cta	agt	7320
S	S	T	S	G	A	T	S	F	G	S	N	E	E	I	S	E	C	L	S	2440
gag	aaa	agc	ctt	tct	atc	cat	agc	aat	gtt	cat	tct	gac	agg	ctg	ttg	gaa	ctc	aag	tcc	7380
E	K	S	L	S	I	H	S	N	V	H	S	D	R	L	L	E	L	K	S	2460
cct	act	gag	ctg	atg	aaa	agt	aag	gag	cgc	agt	gat	gtg	gag	cat	gaa	cag	caa	gtt	act	7440
P	T	E	L	M	K	S	K	E	R	S	D	V	E	H	E	Q	Q	V	T	2480
gaa	tcc	cct	tcc	ttg	gct	tca	gtt	cct	act	gca	gac	gag	tta	ttt	gat	ttc	cac	att	ggt	7500
E	S	P	S	L	A	S	V	P	T	A	D	E	L	F	D	F	H	I	G	2500
gat	agg	gtg	ttg	att	gga	aat	gtt	cag	cca	gga	att	ctt	cga	ttc	aaa	ggt	gag	act	agt	7560
D	R	V	L	I	G	N	V	Q	P	G	I	L	R	F	K	G	E	T	S	2520
ttt	gct	aaa	gga	ttt	tg	gcc	gga	gtg	gag	tta	gat	aaa	cct	gaa	gga	aat	aac	aat	gga	7620
F	A	K	G	F	W	A	G	V	E	L	D	K	P	E	G	N	N	N	G	2540
aca	tat	gat	ggt	att	gca	tat	ttt	gag	tg	aaa	gaa	aag	cat	ggt	att	ttt	gct	cct	cct	7680
T	Y	D	G	I	A	Y	F	E	C	K	E	K	H	G	I	F	A	P	P	2560
caa	aaa	ata	tct	cac	att	cca	gaa	aac	ttt	gat	gac	tat	gta	gac	att	aat	gaa	gat	gaa	7740
Q	K	I	S	H	I	P	E	N	F	D	D	Y	V	D	I	N	E	D	E	2580
gac	tgt	tac	tca	gat	gaa	cga	tat	cag	tg	tat	aat	caa	gag	caa	aat	gat	aca	gag	ggt	7800
D	C	Y	S	D	E	R	Y	Q	C	Y	N	Q	E	Q	N	D	T	E	G	2600
cca	aaa	gac	aga	gaa	aag	gat	gtc	agt	gaa	tat	ttt	tat	gag	aaa	tcc	cta	cct	agt	gtg	7860
P	K	D	R	E	K	D	V	S	E	Y	F	Y	E	K	S	L	P	S	V	2620
aat	gat	ata	gaa	gcc	tca	gtt	aat	aga	agt	aga	agc	ctt	aaa	ata	gaa	aca	gac	aat	gta	7920
N	D	I	E	A	S	V	N	R	S	R	S	L	K	I	E	T	D	N	V	2640
cag	gac	att	tct	ggg	gta	ctt	gaa	gcc	cat	gtt	cac	cag	cag	tct	tca	gtg	gat	tca	cag	7980
Q	D	I	S	G	V	L	E	A	H	V	H	Q	Q	S	S	V	D	S	Q	2660
att	tct	tca	aag	gaa	aac	aaa	gac	ctc	att	tct	gat	gcc	aca	gaa	aag	gtt	tcc	atc	gct	8040
I	S	S	K	E	N	K	D	L	I	S	D	A	T	E	K	V	S	I	A	2680
gca	gaa	gat	gac	act	tta	gac	aat	acc	ttt	tcc	gaa	gaa	ttg	gag	aag	caa	cag	cag	ttt	8100
A	E	D	D	T	L	D	N	T	F	S	E	E	L	E	K	Q	Q	Q	F	2700
aca	gaa	gag	gaa	gac	aac	cta	tat	gct	gaa	gct	tca	gaa	aag	ctt	tgt	aca	cca	ctt	ctg	8160
T	E	E	E	D	N	L	Y	A	E	A	S	E	K	L	C	T	P	L	L	2720
gat	ctt	tta	aca	aga	gaa	aaa	aac	caa	ctg	gaa	gcc	cag	ctg	aag	tca	tca	cta	aat	gag	8220
D	L	L	T	R	E	K	N	Q	L	E	A	Q	L	K	S	S	L	N	E	2740
gaa	aaa	aag	tca	aaa	caa	caa	ctg	gaa	aaa	atc	agc	tta	ctg	aca	gac	agt	tta	cta	aaa	8280
E	K	K	S	K	Q	Q	L	E	K	I	S	L	L	T	D	S	L	L	K	2760
gtc	ttt	gta	aag	gac	aca	gtc	aat	caa	cta	caa	caa	atc	aaa	aaa	acc	agg	gat	gag	aaa	8340
V	F	V	K	D	T	V	N	Q	L	Q	Q	I	K	K	T	R	D	E	K	2780
atc	cag	ctt	agc	aat	cag	gag	ctt	ctt	ggt	gat	gac	caa	aag	aaa	gta	aca	ccc	caa	gac	8400
I	Q	L	S	N	Q	E	L	L	G	D	D	Q	K	K	V	T	P	Q	D	2800

cta tcc caa aat gtt gag gaa cag tcg cca agt att tca ggt tgc ttc tta agt tct gaa	8460
L S Q N V E E Q S P S I S G C F L S S E	2820
ttg gaa gat gaa aaa gaa gag att tcc tct cca gat atg tgt ccc aga ccg gag agc cca	8520
L E D E K E E I S S P D M C P R P E S P	2840
gta ttt ggt gcc agt ggg cag gaa gaa ctt gct aag aga ctt gct gaa ctt gaa ctc agc	8580
V F G A S G Q E E L A K R L A E L E L S	2860
cgg gag ttc ctg agc gcg tta gga gat gat caa gac tgg ttt gat gaa gac ttt ggt ttg	8640
R E F L S A L G D D Q D W F D E D F G L	2880
agc tct tct cac aag atc caa aaa aat aag gca gaa gaa acc att gta cct cta atg gca	8700
S S S H K I Q K N K A E E T I V P L M A	2900
gaa cct aaa aga gta acc caa caa cca tgt gaa aca tta ttg gca gtc ccc cat act gca	8760
E P K R V T Q Q P C E T L L A V P H T A	2920
gaa gaa gta gag att ctt gta cat aat gca gca gaa gaa ctt tgg aaa tgg aaa gaa tta	8820
E E V E I L V H N A A E E L W K W K E L	2940
ggc cac gat ctt cat agc atc agt att cct aca aaa ctg ctt ggc tgt gcc agt aaa ggt	8880
G H D L H S I S I P T K L L G C A S K G	2960
cta gat ata gaa agc act agt aaa agg gtc tac aaa cag gcg gtt ttt gat tta aca aaa	8940
L D I E S T S K R V Y K Q A V F D L T K	2980
gag att ttt gag gaa ata ttt gct gag gat ccc aac tta aat caa cct gtc tgg atg aag	9000
E I F E E I F A E D P N L N Q P V W M K	3000
cca tgt aga atc aac tct agt tat ttc cga cga gtg aaa aat cca aat aac ctt gat gaa	9060
P C R I N S S Y F R R V K N P N N L D E	3020
atc aag agc ttc ata gca agt gaa gta ctc aag ttg ttc agt ctt aaa aag gag cca aac	9120
I K S F I A S E V L K L F S L K K E P N	3040
cac aaa aca gat tgg cag aaa atg atg aaa ttt gga aga aag aaa aga gac cga gtg gat	9180
H K T D W Q K M M K F G R K K R D R V D	3060
cat atc ctg gtt cag gag ctc cat gag gag gag gca cag tgg gtg aac tat gat gag gat	9240
H I L V Q E L H E E E A Q W V N Y D E D	3080
gag ttg tgt gtg aaa atg cag cta gcc gac ggg atc ttt gag acc ctg atc aaa gat act	9300
E L C V K M Q L A D G I F E T L I K D T	3100
att gat gtt ctg aat cag atc agt gaa aag cag ggg aga atg cta cta gtg	9351
I D V L N Q I S E K Q G R M L L V	3117
tgacatcttg caaataaaatc gaacgctgag tgctaattgtg agtcctgggc ctttctgcct	9411
cctgatgtac acccatcgcc atcatagcaa gagtgccttct ggaccttgta cttattctta	9471
aagactacca gtatggagtt cataggacaa tgtggtacac ctgggtattac agcctttgccc	9531
tttcgagact atccactgga ttaatgggtt attttcagtg gccaggggttg cacagtgtaa	9591
tcctacacct ttctctaaca cccctactag gtcccagagg gccagaaaaca cctgacttac	9651
ctctgagttt agactagggt atcacttctt tgagtctgaa gtcaagtgtg agaggtatag	9711
ataaatgcat cacatcactt ttgaaatgta attctgggtct ataccatgga agtcataaat	9771
ggacattata gtctctaaac agtattaaac ccttaaccac ttctaaaata ggcaagctca	9831
ataatgtctg ccaacttcac attctggagt ttatttcatt tctttttgaa gaccattttc	9891
ttccattatt gtagttgagc agcaccaagt ggactgtcag gctaacagga ataagtggta	9951
gccttgcttt ctgagcacca tctaaagaat tttaaaccctc tgcattatgt ttagtgttct	10011
ctgtgtgggc atgaaaacaa agaaatgccc ctactgaaga ctggggtcaa aggaccaatg	10071
cagggctggt tcttttacc cttgggtttac tcttgcactt gtcttactca ttctgaatct	10131
ctaccagctg ctcccagaat cacagatact caggaccatc tcaggcatcc aggcatggca	10191
aagtggaaat aattcattht ggctgcaaaa ccttcaactc ccattctttcc ccaagaagtc	10251
agagatgctg ttacttgaat gatttaggaa atgagtgtgt gcaccaaaga caaaaagata	10311
ttgtctattg ttgtgtgtgt tgttttgccg tatggaacat tttttaattt attttaagat	10371
aaattattaa gttgaaaaatg tgtgtcccta ttcagaagtgt aaagattcat cttgtaatat	10431
ttaaacctcc atcttgaagc ttctatgggt catagtcttt gcacaggaac ctgtgggttt	10491
aacaaaccaa tacacatatt gaagaagtca ttttaattca gtgaaacgaa gatgggcttt	10551
tccagatcac ctgcaatagc agcagtggga taaaatgatt taaaaacact gtacaattta	10611
actctgcctc tcttgcagca ttgcttctca caactattac ctgcatctga aaaaaaatct	10671

atagactcca	gctgctacat	tagagcataa	gagatgctct	cctgggacct	cagtaccctg	10731
ccttccttgac	tggtttccgt	tcatcagtc	tgtccctctt	caagtaatct	agaagaatgt	10791
ggatactctt	aggcgtgaat	gtaaatgcct	taatattgaa	ggtcctgggt	agaagcatga	10851
tacaagacat	ctactggatt	catatttaca	aatatcctgg	aatgttatag	cttcaaagta	10911
tattagaaaa	accccaaaga	tggtataatc	tttaagtgtg	cacgttcggt	tatttctgca	10971
tcttcctctc	aaacttgctt	ttgcatctta	aatatttcac	tatgcacact	cccattctct	11031
ttgggtttca	tcttgctggt	taagaaatgt	actgaaataa	tcattggaat	atttgcattt	11091
tgcacaatga	ctggtatgat	agctcttgac	aaataaggaa	agcactgaaa	tgttgtgatt	11151
gggtctcggg	aaatgctcag	attgatgtct	taccagcatt	tcttctgggc	ttgtgatggt	11211
gagctgtagt	cttgtagcca	taatgagcaa	attgactaag	agaagcaaag	gtttcttggg	11271
gttattaacc	agtagtgtgg	aaatactagt	tttatgtggc	caaggaaaag	caaagccttt	11331
tcttttcagt	ttgtgttatt	tgggaagacag	aaaaacatct	tgtctacatc	ctttggctgt	11391
ttgtaggata	acgttgctct	tacgatactg	aaactttaca	gctgctgtaa	attttttata	11451
aatgaatttc	aaaatgttat	aatgggactg	taggttggtt	ttctacatct	tcattatttg	11511
gacctaaaac	cagtttttaa	taagaaagtt	tatctttact	ctttctgaaa	ttatgactcc	11571
ag						11573

Anhang 1: Nukleotid- und Aminosäuresequenz des humanen CAP350

Die Numerierung der Nukleotidsequenz beginnt mit dem Adenin des Startcodons, der 5'-untranslatierte Bereich wurde darauf bezogen mit negativen Zahlenwerten versehen. Die sieben Kernlokalisierungssignale (NLS) sind grau, die sieben „Coiled-coil“ Domänen grün und die CAP-Gly Domäne rot unterlegt. Das Stopcodon ist fett und das Polyadenylierungssignal fett und kursiv dargestellt. Die Hybridisierungsstellen der in den RT-PCR Analysen verwendeten Primer sind schematisch dargestellt und eventuelle „mismatches“ durch Sterne markiert.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AF	Aktivierungsfunktion
Alexa488	Alexa Fluor 488
AS	Aminosäure(n)
bp	Basenpaare
kb	Kilobasenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
Cy3	Cyanine
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosid-5'Triphosphat
et al.	und andere
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
g	Erdbeschleunigung
GTF	Genereller Transkriptionsfaktor
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
kD	Kilodalton
LB	Luria-Bertanis-Broth
min	Minute(n)
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
RNA	Ribonukleinsäure
RNAPII	RNA-Polymerase II
SDS	Natriumdodecylsulfat
SR	Steroidhormon-Rezeptor
Tab.	Tabelle
TAF	TBP assoziierter Faktor
TBP	TATA-Box bindendes Protein
rpm	Umdrehungen pro Minute

Bei Herrn PD Dr. Ludger Klein-Hitpaß möchte ich mich sehr für die Überlassung der interessanten Themen, sein großes Engagement bei der Betreuung und seine ständige Gesprächsbereitschaft bedanken.

Mein Dank gilt auch den ehemaligen NW1-ern Lothar Vaßen, Diemo Michels, Sabine Kahmann und Wojtek Wegrzyn für den Spaß bei der Arbeit und für ihre Hilfe im Labor.

Allen derzeitigen und früheren Mitarbeitern der AG III und AG IV danke ich für die interessanten Gespräche, für die Unterstützung bei der Arbeit und für die entstandenen freundschaftlichen Verhältnisse.

Ich bedanke mich auch bei allen übrigen Mitarbeitern der Institute für Zell- und Molekularbiologie, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

Mein Dank geht ebenfalls an Michael Derda, der -neben der Beantwortung vieler Fragen zum Bestellwesen- durch Unterhaltungen über alltägliche Dinge den Laboralltag auflockerte.

Bei Florian Röddicker und Matthias Drosten bedanke ich mich für die regelmäßigen Treffen beim Mittagessen.

Dank geht auch nach Frankfurt an Maik Annies für die Zusendung des β -Tubulin Antikörpers und für die Aufmunterungen per e-mail.

Besonderer Dank gilt Anne-Marie Tassin für die Zusendung vieler centrosomaler Antikörper und für die Erstellung des hervorragenden Westernblots.

Für die vielen Tips zur Chromatintranskription und die Zusendung mehrerer Plasmide gilt mein Dank Christian Schwerk.

Bei meiner Freundin Nadine bedanke ich mich für das Leben nach der Arbeit.

Meinen Eltern möchte ich für all ihre Mühen danken, die mir diesen weiten Weg ermöglicht haben.

Und bei meiner Oma, die immer an mich geglaubt hat.

Lebenslauf

Name: Fabian Esser

Geburtstag: 02.06.1971

Geburtsort: Dortmund

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1977-1981	Aloysius-Grundschule in Gladbeck
1981-1990	Ratsgymnasium Gladbeck
1990	Abitur

Grundwehrdienst:

1990-1991	Grundwehrdienst im Stabsdienst in Münster
-----------	-------------------------------------------

Hochschulbildung:

10/1991-9/1997	Studium der Chemie an der Ruhr-Universität Bochum
11/1996-9/1997	Diplomarbeit im Fachbereich Biochemie am Lehrstuhl von Herrn Prof. Benecke mit dem Thema Identifizierung Intron-lokalisierter Promotorelemente
9/1997-1/1998	wissenschaftlicher Angestellter am Lehrstuhl von Herrn Prof. Benecke
2/1998-2/2001	Promotion am Institut für Zellbiologie am Universitätsklinikum in Essen unter der Betreuung von Herrn PD Dr. Klein-Hitpaß
seit 4/2001	wissenschaftlicher Mitarbeiter der FUMEDICA GmbH, Herne



Fabian Esser